

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Spécialité : Neurosciences

Ecole doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie Environnement

ANNEE 2012 – N°

Etude intégrée des variations comportementales, neurochimiques et cellulaires de la cocaïne.

Analyse des variations à court et à long terme. Importance du profil d'administration et anticipation de l'effet renforçant de la drogue.

Thèse présentée par

Stéphanie Puig

Soutenue le 21 novembre 2012

Directrice de thèse
Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Dr. Florence Noble
Pr. Catherine Marchand-Leroux
Pr. Michel Hamon
Dr. Jean Zwiller
Dr. Didier Touzeau
Dr. Nadia Benturquia

Université Paris Descartes
Université Paris Descartes
Université Pierre et Marie Curie
Université de Strasbourg
Hôpital Paul Guiraud
Université Paris Descartes

RESUME

La prise répétée de cocaïne entraîne la mise en place d'une addiction durable. Cette maladie neuropsychiatrique est un problème de santé public majeur en France et dans le monde. Les effets aigus de la cocaïne sont maintenant bien connus mais il est encore difficile d'établir un consensus des conséquences d'une administration répétée de ce psychostimulant au niveau central. En effet, les résultats rapportés dans la littérature actuelle présentent de nombreuses disparités. Nous pensons que cela pourrait être dû aux différences de protocole d'administration utilisés par chaque laboratoire.

Nous émettons l'hypothèse que si à l'heure actuelle il n'existe pas de traitement efficace pour traiter les cocaïnomanes, c'est que les thérapies ne prennent pas en compte les différentes modifications neurobiologiques induites par les différents profils de consommation.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons comparé deux profils d'administration différents de cocaïne chez le rat. Nous nous sommes intéressés aux conséquences comportementales, neurochimiques et cellulaires après un sevrage court et un sevrage long. Nous avons mis en évidence que les adaptations comportementales (activité locomotrice et exploratoire), neurochimiques (dopamine extracellulaire) et cellulaires (récepteurs dopaminergiques) basales et en réponse à une dose de rappel, sont différentes selon le profil d'administration de cocaïne. Nous avons également mis en évidence une anticipation neurochimique dopaminergique et locomotrice, exactement à l'heure habituelle d'injection et qui varie selon le profil d'administration. Dans un deuxième temps, nous avons montré que le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), qui est une neurotrophine du système catécholaminergique, varie à la fois au niveau central et au niveau périphérique, de façon spécifique pour chaque profil d'administration de cocaïne. L'utilisation en clinique de ce biomarqueur périphérique (BDNF), permettrait d'évaluer les variations neurobiologiques centrales chez les patients cocaïnomanes et d'établir un traitement thérapeutique approprié à leur profil de consommation.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse, ont permis de montrer que le profil d'administration a une grande importance sur les conséquences neurobiologiques de la cocaïne.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de juger mon travail.

Merci au **Professeur Catherine Marchand-Leroux** pour avoir accepté de présider le jury.

Merci également au **Professeur Michel Hamon** et au **Docteur Jean Zwiller** pour avoir accepté d'être mes rapporteurs. Enfin, merci au **Docteur Didier Touzeau** pour avoir accepté de venir écouter ma présentation de thèse.

Je voudrais spécialement remercier ma directrice de thèse, le **Docteur Florence Noble**, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et dans son équipe. Merci pour ces moments passés ensemble, ces échanges très enrichissants. J'ai beaucoup appris au cours de ces trois années et je suis très contente d'avoir pu te rencontrer. Merci !

Un très grand merci à mon encadrante, le **Docteur Nadia Benturquia**. Merci pour avoir passé du temps à me former sur le plan technique et sur le plan scientifique. Merci de m'avoir permis de développer mon autonomie et ma réflexion scientifique et de m'avoir fait confiance au cours de ces trois ans. Merci pour ta grande disponibilité, ton écoute et ton pragmatisme. Merci pour tous les conseils que tu m'as donnés au cours de cette thèse, qui m'ont été précieux et qui me serviront par la suite. Je voudrais aussi te remercier pour cette relation que j'ai considérée comme privilégiée avec ma chef, faite de travail, nécessairement, mais aussi de rires et d'échanges en tout genre (discussions, mais aussi chocolats, gâteaux et sucreries !). Merci !

Je voudrais remercier également **Nicolas Marie** et **Corinne Canestrelli**, pour avoir été des collègues de bureau formidables (V'la aut'choz !)

Merci à Nicolas pour ta patience face mes nombreuses questions, pour tes conseils et pour toutes tes connaissances (Monsieur Wiki) qui m'ont été d'une grande aide.

Merci à Coco pour le temps passé ensemble, en manip's avec les ratons (ils sont mignons mignons mignons ...!), dans le bureau, à refaire le monde au café du matin avec un petit dej' ou autour de tes bons mojitos. Je suis très contente d'avoir rencontré une globe trotteuse qui rêve d'égalité et de partage dans le monde entier !

Merci à **Didier** de t'être bien occupé de mes petits rats. Merci pour les moments où on a bien rigolé au café ensemble et merci de nous avoir gâtés avec tes petits paquets en provenance directe de ta région.

Merci à vous 5 pour tous les bons moments que l'on a passé au quotidien au laboratoire. Je suis très contente d'avoir fait partie de votre équipe ! Merci !

Merci à **Mon Ced** d'avoir été là pendant ces trois ans. Je te remercie du fond du cœur pour tes encouragements et ton soutien au quotidien, et surtout pour avoir toujours cru en moi ! Merci beaucoup pour toutes tes intentions, ton réconfort et tes bons petits plats, mais surtout merci énormément pour ton amour et pour tous les moments qu'on partagé ensemble malgré mon travail. Merci aussi pour toutes les années qu'on a déjà passées ensemble et pour toutes celles à venir ! Prêt pour de nouvelles aventures sur un autre continent ?

Merci à mi **querida familia** de m'avoir bien soutenu pendant toute cette thèse et depuis le début de mes études. Merci à **Papito et Mamounette** pour votre amour et vos encouragements. Merci à ma **Gabouche**, d'être ma jumelle ! Merci pour ta folie, et de me tirer toujours vers le haut. Continue à croquer la vie à pleines dents et laisse m'en un peu pour que je la croque avec toi ! Merci aussi à mon **Neng** pour ton intérêt pour mon travail, pour ta gentillesse indétrônable. Je te souhaite d'être un grand chimiste pour qu'un jour on puisse monter un labo ensemble, qui sait, on peut toujours rêver !

Merci à mes super poulettes ! Toujours au top du top, pour un soutien résistant à toute épreuve ! (Dans l'ordre alphabétique parce que je ne peux pas faire de classement de génialité) :

Merci **Cathy**, parce que t'es une meuf géniale (et je crois que t'es condamnée à ça !), Merci **Clem**, pour tes rires et tes massages (d'ailleurs tu m'en dois plein !), Merci à **Fofinette**, d'être la plus forte (aussi en mise en page !), Merci **Méli-Mélo**, d'être toujours disponible pour aller boire un verre (avec ou sans alcool ;)), Merci **Phil**, pour m'avoir donné goût aux sautoirs (et pour tes playlists inoubliables!). Je vous kiffe !

Merci aussi à **Thom**, mon co-réal parce que notre film a fait un carton auprès des lycéens, mais surtout parceque je garderais toujours un très bon souvenir de l'aventure du TMN !

Et enfin, merci aussi à **Marco** !

Merci à la **Soutien's team**®, je suis trop contente d'en faire partie ! Soso... Flavio... Cathy... Didile... j'étais la dernière, ça y est on est tous Docteurs (t'inquiète Nico, toi aussi t'es un Docteur, puisque tu es un escroc !). Vous êtes tous super géniaux et je ne me lasserai jamais de le dire !

Merci **aux copains** d'être toujours là, ça en fait du chemin parcouru depuis le lycée, quelle émotion rien que d'y penser !

Et je demande une standing ovation pour les petits êtres qui méritent le plus d'être remerciés : **mes petits rats**, sans qui rien de tout ça n'aurait été possible !

LISTE DES PUBLICATIONS

PUBLICATIONS :

- Articles dans des revues internationales

S. Puig, F. Noble, N. Benturquia *Short- and long-lasting behavioral and neurochemical adaptations: relationship with patterns of cocaine administration and expectation of drug effects in rats*. **Sous presse**, Translational Psychiatry, 2012.

S. Puig, F. Noble, N. Benturquia. *Different regulation of dopamine receptors according to cocaine pattern of administration*. En préparation.

S. Puig, F. Noble, N. Benturquia. *Different cocaine-induced central and peripheral variations of the Brain-Derived Neurotrophic Factor according to the pattern of administration*. En préparation.

S. Puig, F. Noble, N. Benturquia. *Intermittent and Binge cocaine administration regulate differently glutamate in the mesolimbic system*. Dernières expérimentations en cours.

- Communications avec actes dans un congrès international

Benturquia N., **Puig S.**, Noble F. *Cocaine: two treatments – two different involvement of the dopaminergic system*. **Sous Presse**, Eur. Neuropsychopharmacol, 2012.

POSTERS ET COMMUNICATIONS :

Benturquia N., **Puig S.**, Noble F. *Cocaine: two treatments – two different involvement of the dopaminergic system*. 25ème Collège Européen de Neuropsychopharmacologie, Vienne (Autriche) 13-17 Octobre 2012.

S. Puig, F. Noble, N. Benturquia. *Intermittent and Binge cocaine administration regulate differently the mesolimbic dopamine system*. 8ème Forum Européen des Neurosciences FENS, Barcelone, Espagne. 14-18 Juillet 2012. Prix de participation par la Société des Neurosciences Françaises.

S. Puig, F. Noble, N. Benturquia. *Importance of the administration profile for the neurobiological consequences of cocaine repeated intake*. 3ème journée de l'Ecole doctorale Médicament Toxicologie Chimie Environnement. 10-11 avril 2012

S. Puig, F. Noble, N. Benturquia. *Behavioral, Neurochemical and cellular effects of cocaine*. 2ème journée de l'Ecole doctorale Médicament Toxicologie Chimie Environnement, Mai 2011

S. Puig, F. Noble, N. Benturquia. *Behavioral, Neurochemical and cellular effects of cocaine*. Institut Medicament Toxicologie Chimie et Environnement, Avril 2011

S. Puig, F. Noble, N. Benturquia. *Behavioral, Neurochemical and cellular effects of cocaine*. 1ère journée de l'Ecole doctorale Médicament Toxicologie Chimie Environnement, Mai 2010

S. Puig, F. Noble, N. Benturquia. *Behavioral, Neurochemical and cellular effects of cocaine*. Colloque international des Addictions, Aquitaine conférences, Octobre 2010.

S. Puig, F. Noble, N. Benturquia. *Behavioral, Neurochemical and cellular effects of cocaine*. Colloque Young Researchers in Life Science, Institut Pasteur de Paris, Juin 2010.

Sommaire

Résumé	1
Remerciements	2
Liste des Publications.....	4
Figures	11
Tableaux	12

Première partie : Etude comportementale, neurochimique et cellulaire de la cocaïne 14

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE – Première partie 15

Chapitre I : Généralités.....	16
1. L'addiction, un problème de santé publique majeur	16
a. Origine de la cocaïne et sa consommation dans le monde.	16
b. Définition de l'addiction	17
2. le système de la récompense au centre de l'addiction.....	18
a. La Dopamine	19
i. Le métabolisme de la dopamine	20
ii. Les récepteurs dopaminergiques	21
b. Le noyau accumbens, lieu d'intégration du système mésocorticolimbique.....	22
i. Deux régions dans le noyau accumbens : le core et le shell.....	23
ii. Intégration des informations à l'échelle du réseau.....	24
iii. Intégration des informations à l'échelle synaptique.....	25
c. L'aire Tegmentale Ventrale région de corps cellulaires dopaminergiques.....	26
d. Les afférences glutamatergiques	28
i. Les afférences glutamatergiques du Cortex Préfrontal médian.....	28
ii. Les afférences glutamatergiques limbiques et subcorticales.....	29
3. Conclusion	31
Chapitre II : Etat des connaissances sur la neurobiologie de la cocaïne	32
1. Les effets d'une prise aiguë de cocaïne.....	32
a. Les effets d'une prise aiguë de cocaïne sur la dopamine	32
b. Les effets d'une prise aiguë de cocaïne sur le glutamate.	33
2. Les effets d'une prise répétée de cocaïne.....	33
a. Les effets d'une prise répétée de cocaïne sur le comportement	34
b. Les effets d'une prise répétée de cocaïne sur le système dopaminergique.....	35
i. Modifications de la dopamine extracellulaire	35
ii. Modifications des récepteurs dopaminergiques.....	40
1. Modifications de la densité des récepteurs dopaminergiques.	40
2. Modifications du signal de transduction et réactivité neuronale.	49
iii. Les modifications du système dopaminergique et les comportements de l'addiction.....	50
c. Les effets d'une prise répétée de cocaïne sur le système glutamatergique.....	52
i. Modifications du glutamate extracellulaire.	52
ii. Les modifications du système glutamatergique et les comportements de l'addiction.....	54
d. Interactions entre le système dopaminergique et le système glutamatergique dans les processus de l'addiction	57
3. Réponses comportementales et neurobiologiques à une dose de rappel de cocaïne.	58
a. Réponses comportementales à une dose de rappel de cocaïne.	58
b. Réponses dopaminergiques à une dose de rappel.	61
c. Réponses glutamatergiques à une dose de rappel.	62
4. L'Anticipation de la prise de cocaïne.....	62
5. Conclusion.	64

OBJECTIFS ET HYPOTHESE – Première partie	65
TRAVAIL EXPERIMENTAL – Première partie	68
Materiel et Méthodes	69
Principes et Paramètres des méthodes utilisées :	70
1. Les animaux.	70
2. Les deux profils d'administration de cocaïne.	70
3. Analyse des conséquences comportementales.	70
a. Mesure de la locomotion par actimétrie	70
b. Evaluation comportementale par Open field.	71
4. Analyse des conséquences neurochimiques.....	72
a. La microdialyse intracérébrale <i>in vivo</i> sur rats vigiles.....	72
i. Implantation de canules guides par stéréotaxie.	72
ii. La microdialyse intracérébrale <i>in vivo</i>	73
b. Dosage des neurotransmetteurs dans les microdialysats par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à de la coulométrie.	74
5. Analyse de la variation de la densité des récepteurs dopaminergiques.	79
Procédures expérimentales :	81
1. Etude des modifications directement induites par l'administration répétée de cocaïne.	81
2. Etude de l'anticipation de l'effet renforçant de la cocaïne à l'heure d'injection sans présentation d'indices de rappel.	83
3. Etude de la réponse à l'injection d'une dose de rappel de cocaïne.....	85
4. Précaution mise en œuvre pour l'ensemble des expérimentations menées pour cette étude.....	86
Résultats	87
Objectif 1 : Etude des modifications induites par l'administration répétée de cocaïne.	88
1. Activité locomotrice spontanée.	89
2. Taux de dopamine extracellulaire dans le noyau accumbens core.....	90
3. Densité des récepteurs dopaminergiques D1-like et D2-like dans les structures mésolimbiques et nigro-striées	91
a. Récepteurs dopaminergiques D1-like.....	91
b. Récepteurs dopaminergiques D2-like.....	93
Objectif 2 : Etude de l'anticipation de l'effet renforçant de la cocaïne, sans présentation d'indices de rappel.	95
1. L'anticipation locomotrice.....	96
2. L'anticipation neurochimique.	98
Objectif 3 : Etude de l'effet d'une dose de rappel de cocaïne.	99
1. Analyse de la réponse comportementale à une dose de rappel de cocaïne.....	100
a. L'activité locomotrice.....	100
b. L'activité exploratoire.	102
i. Réponse exploratoire des animaux intermittents.....	102
ii. Réponse exploratoire des animaux binge.	104
c. Les stéréotypies	106
2. Analyse de la réponse neurochimique dopaminergique à une dose de rappel de cocaïne.....	108

DISCUSSION – Première partie	110
Discussion des résultats.	111
1. Les modifications induites par l’administration répétée de cocaïne selon nos deux profils d’administration.....	111
2. Mise en évidence d’une anticipation des effets renforçants de la cocaïne à l’heure d’injection.	114
3. Les conséquences de nos deux profils d’administration répétée de cocaïne en réponse à l’injection d’une dose de rappel de cocaïne après un sevrage.	116
4. Résultats attendus pour le glutamate.	119
Conclusion.	121
Perspectives	123

Deuxième partie : A la recherche d'un biomarqueur pour l'addiction125

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE – Deuxième partie127

1. Le BDNF 128
 - a. Synthèse et maturation. 128
 - b. Le récepteur TrkB et les voies de signalisation activées. 128
2. Le BDNF, facteur neurotrophique du système mésocorticolimbique. 129
3. Le BDNF, un biomarqueur potentiel des maladies psychiatriques. 130
4. Le BDNF et la cocaïne. 131
 - a. Effets aigus de la cocaïne sur le BDNF. 131
 - b. Effets d'une prise répétée de cocaïne sur le BDNF. 132
5. Un facteur neurotrophique modulateur de la dépendance à la cocaïne. 133

OBJECTIF ET HYPOTHESES – Deuxième partie135

TRAVAIL EXPERIMENTAL – Deuxième partie138

Matériel et Méthodes139

- Principe et paramètres des méthodes utilisées 140
1. Analyse des modifications du BDNF dans différents compartiments biologiques. 140
- Procédures expérimentales..... 143
1. Etude des modifications de BDNF induites par les deux profils d'administration. 143

Résultats145

- Objectif 1 : Etude des variations basales de BDNF 146
- a. Dosage des taux de base de BDNF après un jour de sevrage. 147
 - b. Dosage des taux de base de BDNF après 14 jours de sevrage. 149
- Objectif 2 : Etude des variations de BDNF lors de l'anticipation des effets renforçants de la drogue..... 150
- a. Dosage des taux de BDNF aux heures d'injection, après un jour de sevrage. 151
 - b. Dosage des taux de BDNF aux heures d'injection, après 14 jours de sevrage..... 153

DISCUSSION – Deuxième partie.....155

- Discussion des résultats 156
1. Modifications du BDNF basal 156
 2. Modifications du BDNF lors de l'anticipation..... 158
- Perspectives 162

<i>Références Bibliographiques</i>	164
--	------------

<i>Annexe</i>	177
---------------------	------------

FIGURES

Figure 1. Localisation des principales connexions du système mésocorticolimbique chez l'homme et le rat.	19
Figure 2. Schéma du métabolisme de la dopamine dans l'élément présynaptique.	20
Figure 3. Schéma des principales connexions du noyau accumbens dans le système mésocorticolimbique.	23
Figure 4. Le core et le shell du noyau accumbens. Principales afférences et efférences.	24
Figure 5. Schéma de l'intégration des informations dopaminergiques et glutamatergiques à l'échelle synaptique dans le noyau accumbens.	26
Figure 6. Principales connexions de l'aire tegmentale ventrale dans le système mésocorticolimbique.	27
Figure 7. Principales connexions du cortex préfrontal dans le système mésocorticolimbique.	28
Figure 8. Projections régionalisées du cortex préfrontal médian vers le noyau accumbens chez le rat.	29
Figure 9. Principales structures émettant des afférences vers le système mésocorticolimbique.	30
Figure 10. Effet d'une prise aiguë de cocaïne sur la dopamine.	32
Figure 11. Régulation du taux de glutamate extracellulaire au niveau synaptique.	52
Figure 12. Dessin des sutures crâniennes de rongeur.	72
Figure 13. Schéma d'une sonde de microdialyse.	73
Figure 14. Schéma de localisation de la sonde de microdialyse pendant les prélèvements.	74
Figure 15. Principe de fonctionnement de l'HPLC.	75
Figure 16. Chromatogramme d'un microdialysat pour le dosage de la dopamine.	76
Figure 17. Couple Redox de la dopamine (d'après Tang, Kumar et Chen, 2008.)	77
Figure 18. Formule du glutamate, du GABA et de l'agent dérivatisant, l'O-phthalaldéhyde (OPA).	78
Figure 19. Procédure de mesure de l'activité locomotrice après les traitements.	81
Figure 20. Procédure de mesure de la variation des taux de neurotransmetteurs basaux après les traitements.	82
Figure 21. Procédure de mesure de la variation de la densité des récepteurs dopaminergiques après les traitements.	83
Figure 22. Procédure de mesure de la variation des neurotransmetteurs lors de l'anticipation.	84
Figure 23. Procédure de mesure de la réponse locomotrice à une dose de rappel de cocaïne.	85
Figure 24. Procédure de mesure de la réponse neurochimique à une dose de rappel de cocaïne.	86
Figure 25. Activité locomotrice spontanée.	89
Figure 26. Taux de dopamine extracellulaire après 1 jour et 14 jours de sevrage.	90
Figure 27. Densité des récepteurs D1-like en conséquence à nos deux profils d'administration.	92
Figure 28. Densité des récepteurs D2-like, en conséquence à deux profils d'administration.	94
Figure 29. Anticipation comportementale.	97
Figure 30. Dopamine extracellulaire dans le core du noyau accumbens, à l'heure habituelle d'injection.	98
Figure 31. Réponse locomotrice à l'injection d'une dose de rappel de cocaïne.	101
Figure 32. Expression de stéréotypies en réponse à une dose de rappel de cocaïne.	107
Figure 33. Dopamine extracellulaire dans le noyau accumbens core en réponse une dose de rappel de cocaïne.	109
Figure 34. Voies de signalisation du récepteur TrkB activés par le BDNF.	129
Figure 35. Expression du BDNF dans le système mésocorticolimbique.	130
Figure 36. Dosage d'un antigène par la méthode ELISA double sandwich.	140
Figure 37. Zones de prélèvement des structures cérébrales pour le dosage de BDNF.	141
Figure 38. Procédure de mesure des variations de BDNF après les traitements à la cocaïne.	143
Figure 39. Procédure de mesure des variations de BDNF aux heures d'injections de la cocaïne.	144
Figure 40. Mesure des taux de base de BDNF basal après un jour de sevrage.	148
Figure 41. Mesure des taux de base de BDNF après 14 jours de sevrage.	149
Figure 42. Mesure des taux de BDNF à l'heure d'injection de la cocaïne, après un jour de sevrage.	152
Figure 43. Mesure des taux de BDNF à l'heure d'injection, après 14 jours de sevrage.	154

TABLEAUX

<i>Tableau 1. Les récepteurs dopaminergiques.....</i>	<i>22</i>
<i>Tableau 2. Etudes rapportant une diminution des taux de base de dopamine extracellulaire.....</i>	<i>37</i>
<i>Tableau 3. Etudes rapportant une augmentation des taux de base de dopamine extracellulaire</i>	<i>39</i>
<i>Tableau 4. Etudes ne rapportant pas de modification des taux de base de dopamine extracellulaire.....</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 5. Variation de la densité des récepteurs dopaminergiques D1-like dans la voie mésocorticolimbique .</i>	<i>42</i>
<i>Tableau 6. Variation de la densité des récepteurs dopaminergiques D1-like dans la voie nigrostriée</i>	<i>44</i>
<i>Tableau 7. Variation de la densité des récepteurs dopaminergiques D2-like dans la voie mésocorticolimbique .</i>	<i>46</i>
<i>Tableau 8. Variation de la densité des récepteurs dopaminergiques D2-like dans la voie nigrostriée</i>	<i>48</i>
<i>Tableau 9. Etudes rapportant une diminution des taux de base de glutamate extracellulaire</i>	<i>54</i>
<i>Tableau 10. Etudes ne rapportant pas de modification des taux de base de glutamate extracellulaire.</i>	<i>54</i>
<i>Tableau 11. Réponses comportementales à une dose de rappel suite à un traitement répété à la cocaïne.</i>	<i>60</i>
<i>Tableau 12. Réponse exploratoire du groupe intermittent, à une injection de rappel de saline ou de cocaïne.</i>	<i>103</i>
<i>Tableau 13. Réponse exploratoire du groupe binge, à une injection de rappel de saline ou de cocaïne par rapport aux contrôles</i>	<i>105</i>
<i>Tableau 14. Récapitulatif des adaptations comportementales et neurochimiques induites par nos deux profils d'administration de cocaïne.....</i>	<i>122</i>
<i>Tableau 15. Récapitulatif du sens et de l'intensité des variations observées pour les taux de BDNF à la suite des 14 jours d'administrations répétées de cocaïne.....</i>	<i>161</i>

Abréviations

3-MT	3-methoxytyramine
AC	Adénylate Cyclase
AcbC	Core du noyau accumbens
AcbSh	Shell du noyau accumbens
AKT ou PkB	Protéine kinase B
Amy	Amygdale
AMPA	Acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque
BDNF	<i>Brain-Derived-Neurotrophic Factor</i> (Facteur neurotrophique du cerveau)
Cg1	Cortex cingulaire aire 1
COMT	Catéchol-O-méthyl transférase
CPF	Cortex Préfrontal
CPFm	Cortex Préfrontal médian
CPu	Caude Putamen
CREB	<i>CRE-binding protein</i> (Protéine liée à CRE)
Cx Cg	Cortex Cingulaire
DAT	<i>Dopamine Transporter</i> (Transporteur dopaminergique)
DOPAC	Acide 3,4-Dihydroxyphenylacétique
Ec	Cortex entorhinal
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> (Kinase régulée par des signaux extracellulaires)
Fmi	Forceps mineur du corps calleux
GABA	<i>Gamma amino butyric acid</i> (Acide Gamma amino butirique)
Gcc	Genou du corps calleux
Hipp	Hippocampe
i.p.	Intrapéritonéale
i.v.	Intraveineuse
IPSP	<i>Inhibitory postsynaptic potential</i> (Potentiel postsynaptique inhibiteur)
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
LC	Locus Coeruleus
LTP	<i>Long Term Potentiation</i> (Potentialisation à long terme)
LTD	<i>Long Term Depression</i> (Dépression à long terme)
MSN	<i>Medium Spiny Neurons</i> (Neurones épineux moyens)
MAO	Monoamine oxydase
ML	Medio latéral
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> (Protéine kinase active par des agents mitogènes)
MII	Cortex moteur secondaire
MI	Cortex moteur primaire
Nac	Noyau accumbens
NGF	<i>Nerve-Growth Factor</i> (Facteur de croissance neuronale)
NET	<i>Norepinephrin transporter</i> (Transporteur noradrénergique)
PKC	Phospho kinase C
PKA	Phospho Kinase A
PLC γ	Phospho Lipase C gamma
PI3K	Phosphatidyl-inositol 3
PV	Pallidum Ventral
Rack1	<i>Receptor for activated C kinase 1</i> (Récepteur pour kinase C active 1)
s.c.	Sous cutanée
S1 ou S1J	Cortex somatosensoriel primaire
SERT	<i>Serotonin transporter</i> (Transporteur sérotoninergique)
TrkB	Tyrosine Kinase B
VMAT2	<i>Vesicular Monoamine Transporter 2</i> (Transporteur vésiculaire des monoamines 2)

PREMIERE PARTIE : ETUDE COMPORTEMENTALE, NEUROCHIMIQUE ET CELLULAIRE DE LA COCAÏNE

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE – PREMIERE PARTIE



Chapitre I : Généralités.

1. L'addiction, un problème de santé publique majeur

a. Origine de la cocaïne et sa consommation dans le monde.

La cocaïne est un psychostimulant puissant contenu naturellement dans les feuilles de cocaïer. Cet arbuste originaire des Andes est cultivé en Amérique du sud, en Indonésie et dans l'est Africain. La cocaïne était à l'origine consommée dans les pays andins afin d'aider à supporter l'altitude, le froid et la faim dans les hauteurs de la Cordillère des Andes.

Ce psychostimulant n'a été introduit en France qu'en 1750 par Joseph de Jussieu et sa formule brute a été déterminée en 1865 par un autrichien, Whilem Lossen, prouvant qu'il s'agissait d'un alcaloïde.

Avant de connaître ses propriétés addictives puissantes, la cocaïne a été utilisée et prescrite par de nombreux psychiatres et médecins de renommée comme Sigmund Freud. Ils pensaient en effet, avoir trouvé le remède miracle pour soigner la morphinomanie, l'alcoolisme ou les troubles gastriques et étaient très intéressés par ses propriétés d'anesthésique local car il n'existait à cette époque encore aucune molécule ayant cette propriété. A cette époque, la cocaïne est également introduite dans de nombreux produits alimentaires pour ses propriétés énergisantes et devient très populaire puisqu'elle est consommée dans du vin (le vin Mariani en France), des pastilles ou des élixirs, mais aussi dans le coca-cola aux Etats-Unis, qui fut inventé en 1886 (la présence de cocaïne dans le coca cola persistera d'ailleurs jusqu'en 1926 !).

A cause de cet engouement important pour la cocaïne, et l'observation progressive de ses propriétés addictives, la cocaïnomanie est peu à peu dénoncée et c'est seulement en 1914 que l'« Harrison act » est adopté aux Etats-Unis afin de réglementer l'usage et la distribution de la cocaïne.

En 1961, la convention unique sur les stupéfiants est créée permettant une législation internationale sur la prohibition de la production, du commerce, de la détention et de l'usage des drogues illicites et conduisant à la création de l'OICS (Organe International de contrôle des stupéfiants). L'OICS devient responsable de la mise en œuvre des conventions de l'ONU sur les drogues.

Malgré la prohibition de la cocaïne dans la plus part des pays du monde, sa consommation reste un problème de santé publique majeur mondial.

En Europe, la cocaïne est la deuxième drogue la plus consommée illicitement après le cannabis. D'après le rapport de l'OICS en 2011, 1.2% des adultes âgés de 15 à 64 ans en Europe occidentale et centrale, disent avoir consommé de la cocaïne au cours de l'année écoulée. De plus, une étude réalisée en 2006 révèle que 3% des jeunes de 15 ans en France disent consommer de la cocaïne de façon régulière (données françaises de l'enquête internationale HBSC, 2006). Aux Etats-Unis, premier pays consommateur au monde, 9% des 1 963 089 admissions de patients dépendants à des

substances psychotropes sont liées à l'usage de cocaïne. L'ensemble de ces chiffres est en constante évolution car bien que la cocaïne ait longtemps été considérée comme réservée aux milieux privilégiés et fortunés, la baisse des prix de vente a entraîné un élargissement de sa consommation à des classes sociales plus modestes.

En plus des dégâts humains causés directement par la consommation de cette drogue dans le monde, l'OICS note que le coût humain économique et social de l'usage illicite de drogues à grande échelle est exorbitant, notamment en Amérique du Nord. En effet, le nombre de décès liés à la drogue dépasse désormais le nombre de décès causés par les armes à feu ou par les accidents de la route aux Etats-Unis.

De plus, le trafic illégal, causé par la demande de drogue des pays du Nord est également responsable de nombreuses violences dans les pays producteurs ou de transit. Par exemple, le Mexique est un important lieu d'origine et de passage de la cocaïne et le nombre d'assassinats liés au trafic de drogue a atteint de 24 374 en 2010. Malgré les efforts de ces pays à lutter contre les trafics, les groupes de trafiquants se sont employés à affaiblir les états dans leur justice pénale et leurs médias, par le biais de la corruption, de menaces et de manœuvres d'intimidation, ce qui rend très difficile la lutte contre la drogue.

Il est donc primordial d'arriver à comprendre les mécanismes neurobiologiques de l'addiction et d'établir des cibles thérapeutiques efficaces pour arriver à traiter cette pathologie et diminuer le nombre de consommateurs dans le monde.

b. Définition de l'addiction

L'addiction est une maladie neuropsychiatrique de rechute chronique, caractérisée par la recherche et la consommation compulsive et incontrôlée d'une substance psycho-active, associée à l'émergence d'un état émotionnel négatif lors d'un sevrage à cette substance.

Le « Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders » (DSM IV) paru en 1994, distingue deux types de consommations pathologiques dans l'addiction, qui sont l'usage avec abus et la dépendance.

L'usage avec abus est défini comme la consommation d'une substance de façon régulière au détriment de la condition socio-professionnelle du consommateur, le plaçant dans des situations illicites voire dangereuses. Bien que le consommateur avec abus soit conscient de ces préjudices et des risques de conflit qu'engendre son comportement sous l'emprise de drogue, il maintient sa consommation. La dépendance marque quant à elle, un état plus avancé de la pathologie puisqu'elle est établie lorsque l'individu manifeste des symptômes physiologiques et psychologiques, résultant d'adaptations neurobiologiques complexes au niveau du système nerveux central. On compte parmi

ces symptômes, l'état émotionnel négatif profond (dysphorie, irritabilité, alexithymie...) engendré par un sevrage ce qui pousse le malade à consommer pour éviter cet état. L'individu est conscient que ses problèmes psychiques et physiologiques viennent de sa consommation mais est incapable de l'arrêter. Il passe la majeure partie de son temps à consommer ou à être sous l'emprise de la drogue ce qui provoque une diminution importante de ses activités sociales voire une désocialisation totale.

Une des principales caractéristiques de cette pathologie est que les individus peuvent rechuter malgré des années d'abstinence et de souffrance traversée pendant le sevrage. Ceci est dû à l'émergence d'une envie très forte (comparable à une pulsion irrépressible de consommer le produit tel que l'envie de boire pour la soif ou de l'envie de manger pour la faim). Cette sensation incontrôlable et incontrôlée est appelée « craving » et survient souvent lors de l'exposition de l'individu à des environnements, des indices, des contextes qui ont été associés à la prise de la drogue et qui provoquent le rappel de la trace mnésique addictive. L'envie irrépressible de consommer est donc due au besoin d'obtenir les effets renforçants de la substance mais aussi l'anticipation des effets négatifs du sevrage, ce qui pousse la personne dépendante à consommer pour les éviter (Shurman et al, 2010).

Au niveau du système nerveux central, c'est le système de la récompense, chargé de réguler de grandes fonctions cognitives telles que la motivation, les émotions, la mémoire mais aussi le plaisir, qui est principalement perturbé par la prise de drogue.

2. le système de la récompense au centre de l'addiction

Le système de la récompense est un système essentiel dans le cerveau, il est constitué principalement de trois structures en interaction (i) l'aire tegmentale ventrale au niveau mésencéphalique, (ii) le cortex préfrontal médian au niveau cortical et (iii) le noyau accumbens du striatum ventral, lié au système limbique : c'est le système mésocorticolimbique (figure 1).

La première évocation de ce système est faite en 1954 par deux électrophysiologistes, Olds et Milner qui définissent les zones induisant un renforcement positif lors de stimulations électriques intracrâniennes chez le rat. Ils parlent alors de centres de la motivation et du renforcement et insistent sur le rôle central de ce système dans les processus d'apprentissage par l'hédonie et la motivation (voir les revues Olds et Fobes, 1981 et Milner, 1991).

Ce système est constitué de neurones dopaminergiques dont les corps cellulaires situés dans l'aire tegmentale ventrale projettent vers le noyau accumbens majoritairement et le cortex préfrontal médian. C'est la libération de dopamine dans le noyau accumbens, induite par la perception de renforcements positifs, qui entraîne une sensation de plaisir. Ceci est régulé par des interneuronnes

inhibiteurs GABAergiques et des afférences glutamatergiques excitatrices en provenance du cortex préfrontal médian et d'autres structures limbiques pour l'intégration contextuelle, émotionnelle et exécutive du message renforçant. Ce système est également en interaction avec les autres systèmes modulateurs catécholaminergiques, tel que le système sérotoninergique par des afférences en provenance du Raphé et le système noradrénergique par des afférences en provenance du locus coeruleus (Salomon et al, 2006 ; Tassin et al, 2006).

Bien que les drogues aient des cibles pharmacologiques différentes selon leur classe d'appartenance, elles possèdent un mécanisme commun sur ce système qui est l'augmentation exacerbée de dopamine dans le noyau accumbens (Di Chiara et Imperato, 1988).

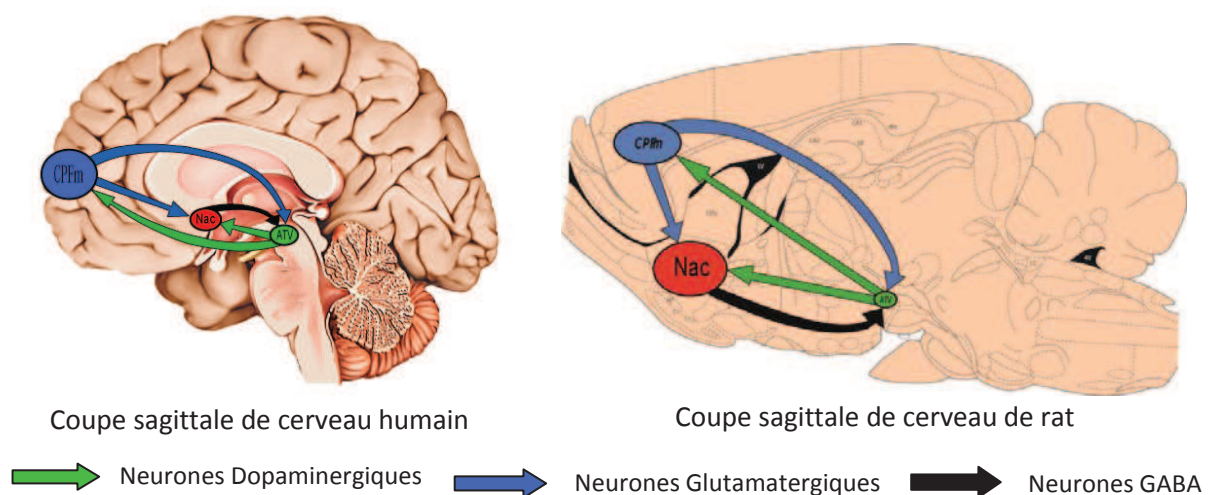


Figure 1. Localisation des principales connexions du système mésocorticolimbique chez l'homme et le rat.

(CPFm : cortex préfrontal médian ; ATV : aire tegmentale ventrale ; Nac : noyau accumbens)

a. La Dopamine

La dopamine est un neurotransmetteur central et périphérique. Elle fait partie de la famille des catécholamines comme la noradrénaline et la sérotonine. Par opposition avec les neurotransmetteurs excitateurs ou inhibiteurs, les catécholamines véhiculent un message modulateur dont la valence et l'intensité varient selon la zone cérébrale ciblée et le type de récepteur activé.

i. Le métabolisme de la dopamine

La dopamine est synthétisée dans les neurones dopaminergiques (figure 2). Le précurseur initial de la dopamine, la tyrosine, est d'abord transformé en L-DOPA par la tyrosine hydroxylase. La L-DOPA est ensuite prise en charge par la dopamine décarboxylase qui synthétise le neurotransmetteur clef : la dopamine (Kopin et al, 1968). La dopamine une fois synthétisée est captée dans les vésicules par le transporteur vésiculaire de monoamines VMAT2.

Une fois la dopamine contenue dans les vésicules VMAT2, elle est libérée dans la fente synaptique où elle va pouvoir exercer son activité physiologique sur l'élément postsynaptique.

La quantité de dopamine extracellulaire est régulée par les transporteurs dopaminergiques (DAT) situés sur l'élément présynaptique qui sont capables de ramener la dopamine du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire présynaptique, afin qu'elle soit recyclée (Smith et Reith, 2010). De plus, deux enzymes métabolisent la dopamine pour réguler sa concentration au niveau extracellulaire comme intracellulaire. La monoamine oxydase (MAO) transforme la dopamine en DOPAC qui a son tour est transformée en HVA par la catéchol O-méthyltransférase (COMT). Cette dernière peut également transformer la dopamine en 3-méthoxytyramine (3-MT) (Vogt et al, 1969).

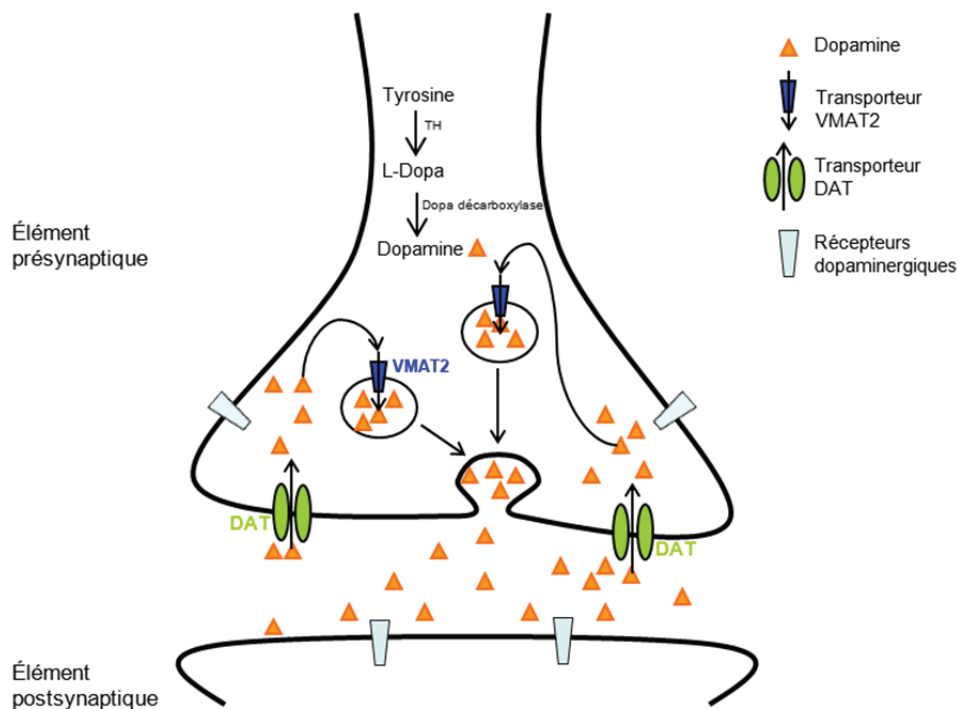


Figure 2. Schéma du métabolisme de la dopamine dans l'élément présynaptique.

TH : Tyrosine Hydroxylase, L-Dopa : L-3,4-dihydroxyphenylalanine, VMAT2 : Vesicular Monoamine Transporter 2, DAT : Dopamine Transporter.

ii. Les récepteurs dopaminergiques

Nous connaissons à l'heure actuelle cinq types de récepteurs de la dopamine. Ces récepteurs métabotropiques font partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G à sept domaines transmembranaires. Les cinq types de récepteurs sont classés selon deux groupes en fonction de la nature de la protéine G à laquelle ils sont associés ainsi qu'en fonction de leur homologie de séquence (Sibley et al, 1993). On distingue les récepteurs de type 1 (D1-like), incluant les D1 et les D5 et les récepteurs de type 2 (D2-like) incluant les D2, D3 et D4 (Tableau 1). Les D1-like sont couplés aux protéines G stimulatrices (G_{sa}/G_{olfa}) et activent les voies de transduction de l'adénylate cyclase et de la phospholipase C γ , en faveur de l'activation neuronale et de l'amplification du signal. Les D2-like sont couplés aux protéines G inhibitrices (G_{ia}/G_{oa}) qui inhibent l'activation de l'adénylate cyclase et agissent sur d'autres systèmes d'inhibition de l'activité neuronale comme l'activation de la conductance potassique et l'atténuation de l'influx calcique conduisant à l'hyperpolarisation neuronale (Anderson et Pierce, 2005).

Les récepteurs D1 et D2 sont les plus largement exprimés dans le cerveau. Ils sont présents dans les structures recevant des afférences dopaminergiques, en particulier dans le striatum dorsal, le tubercule olfactif et le noyau accumbens et de façon moins importante dans l'hippocampe, le néocortex, l'hypothalamus, le thalamus et l'amygdale (uniquement pour les D1). Dans le noyau accumbens, les efférences vers l'aire tegmentale ventrale (majoritairement en provenance de la partie shell du noyau accumbens) expriment uniquement les récepteurs D1, tandis que les neurones projetant vers le pallidum ventral expriment soit les D1 ou les D2 exclusivement, soit les deux à la fois (Anderson et Pierce, 2005). Cette répartition permet une synergie dans le signal véhiculé par les efférences du noyau accumbens. Une synergie d'activité est également présente entre les D1 et les D2 puisque les effets post synaptiques des D2 dépendent de l'activation des D1 (Walters et al, 1987). Les récepteurs D3, D4 et D5 sont quant à eux exprimés de façon beaucoup moins importante dans le cerveau et ont une distribution ciblée. Les D3 sont exprimés dans le shell du noyau accumbens et les îlots de Calleja, les D4 dans les régions limbiques spécifiquement telles que le noyau accumbens, l'hippocampe, l'amygdale et le cortex préfrontal et enfin les D5 dans les noyaux thalamiques, l'hippocampe et l'hypothalamus (Sibley et al, 1993).

Il est important de noter que les récepteurs D2 et D3 en plus d'être localisés sur les neurones post synaptiques, sont exprimés par les neurones mésencéphaliques dopaminergiques, sur les terminaisons axonales et la partie somatodendritique. Ils peuvent donc être présynaptiques et exercer une fonction d'autorécepteurs inhibiteurs sur ces neurones pour la régulation de la libération de dopamine (Tepper et al, 1997). Les récepteurs D2 sont divisés en deux isoformes, une courte, les D2S et une plus longue de 29 acides aminés, les D2L (Giros et al, 1989), ils sont localisés au niveau

présynaptique et post synaptique respectivement (Centonze et al, 2004). Ce sont donc les D2S qui jouent un rôle d'autorécepteur et les D2L qui interagissent avec le D1 au niveau post synaptique. Ces deux isoformes sont couplées à des protéines Gi différentes (Guiramand et al, 1995) et ont des fonctions physiologiques différentes (Usiello et al, 2000, Wang et al, 2000).

Tableau 1. Les récepteurs dopaminergiques

	Récepteurs Dopaminergiques de type 1		Récepteurs Dopaminergiques de type 2		
	D1	D5	D2	D3	D4
Protéine G associée	$G_{sa}/G_{olf\alpha}$	$G_{sa}/G_{olf\alpha}$	$G_{ia}/G_{o\alpha}$	$G_{ia}/G_{o\alpha}$	$G_{ia}/G_{o\alpha}$
Activateur / Inhibiteur	Activateur	Activateur	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur
Localisation	Striatum, Tubercules olfactifs Nac Hippocampe Néocortex Hypothalamus Thalamus Amygdale	Noyaux thalamiques Hippocampe Hypothalamus	Striatum, Tubercules olfactifs, Nac Hippocampe Néocortex Hypothalamus Thalamus	Nac Shell îlots de Calleja	Nac Hippocampe Amygdale CPF

(Nac : noyau accumbens, CPF : cortex préfrontal.)

b. Le noyau accumbens, lieu d'intégration du système mésocorticolimbique

Le noyau accumbens fait partie du complexe striatal, il est situé dans la partie ventrale du striatum. C'est la principale cible des terminaisons dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale et la libération de dopamine est associée à l'apprentissage par la motivation et aux renforcements. C'est également le point de convergence d'afférences glutamatergiques et dopaminergiques pour la régulation de la motivation (figure 3.). Le noyau accumbens est constitué à 90% de neurones spécifiques au striatum, les neurones épineux moyens GABAergiques ou *medium spiny neurons* (MSNs), dont l'importante arborisation dendritique est très riche en épines (Meredith et al, 1999, Noble, 2008) ce qui favorise leur connexion avec de nombreuses afférences. Les 10% de neurones restants sont des interneurones inhibiteurs cholinergiques et parvalbumine.

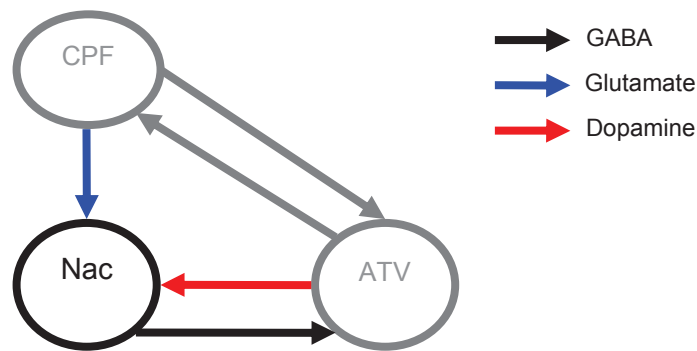


Figure 3. Schéma des principales connexions du noyau accumbens dans le système mésocorticolimbique

(CPF : Cortex préfrontal, ATV, Aire tegmentale ventrale, Nac : Noyau accumbens).

i. Deux régions dans le noyau accumbens : le core et le shell

Le noyau accumbens est divisé en deux régions principales : le core, partie centrale qui entoure la commissure antérieure et qui est liée au striatum dorsal et le shell, partie ventrale et médiane, aussi considérée comme étant un prolongement du système limbique.

Ces deux régions se distinguent par leurs particularités morphologiques, neurochimiques mais aussi par leurs connexions et leurs fonctions (Heimer et al, 1991, Voorn et al, 1989).

Le core reçoit des afférences en provenance du cortex préfrontal médian dorsal (de l'aire prélimbique et cortex cingulaire antérieur), de l'amygdale rostrale, du thalamus caudal et rostral et de l'aire tegmentale ventrale latérale. Il émet à son tour des efférences parallèles à celles du striatum dorsal vers le pallidum ventral dorsal et subcortical ainsi que vers la substance noire réticulée (lieu des corps cellulaires dopaminergiques de la voie motrice nigro-striée).

Le shell reçoit plutôt des afférences du cortex préfrontal médian ventral (prélimbique ventral et infralimbique), de l'hypothalamus ventral et dorsal, de l'amygdale caudale, du thalamus paraventriculaire et de l'aire tegmentale ventrale postéro médiane. Ses efférences ciblent plus particulièrement le pallidum ventral ventromédian, l'hypothalamus latéral mais aussi l'aire tegmentale ventrale et la substance noire compacte via des collatérales d'axones des MSNs (Basar et al, 2010) (voir figure 4).

Le rôle spécifique de ces deux régions du noyau accumbens est inhérent à leur schéma connectique. La région shell, étroitement liée avec le système limbique est souvent considérée comme faisant partie de l'amygdale étendue, elle est impliquée dans les comportements non appris instinctifs et liés aux émotions. Elle est directement activée lors de renforcements positifs non conditionnels et est associée aux effets récompensants de la prise de drogue (Ikemoto, 2007). La région core est quant à elle liée au système moteur de façon plus importante et sa composition structurale, très proche de

celle du striatum, en font une structure intermédiaire entre le système moteur et les afférences limbiques, qui sont interprétées par le shell. Elle est associée à des comportements appris, à des associations conditionnées et au comportement de recherche de drogue, elle permet d'établir l'orientation d'un comportement avec un but (Groenewegen et al, 2007).

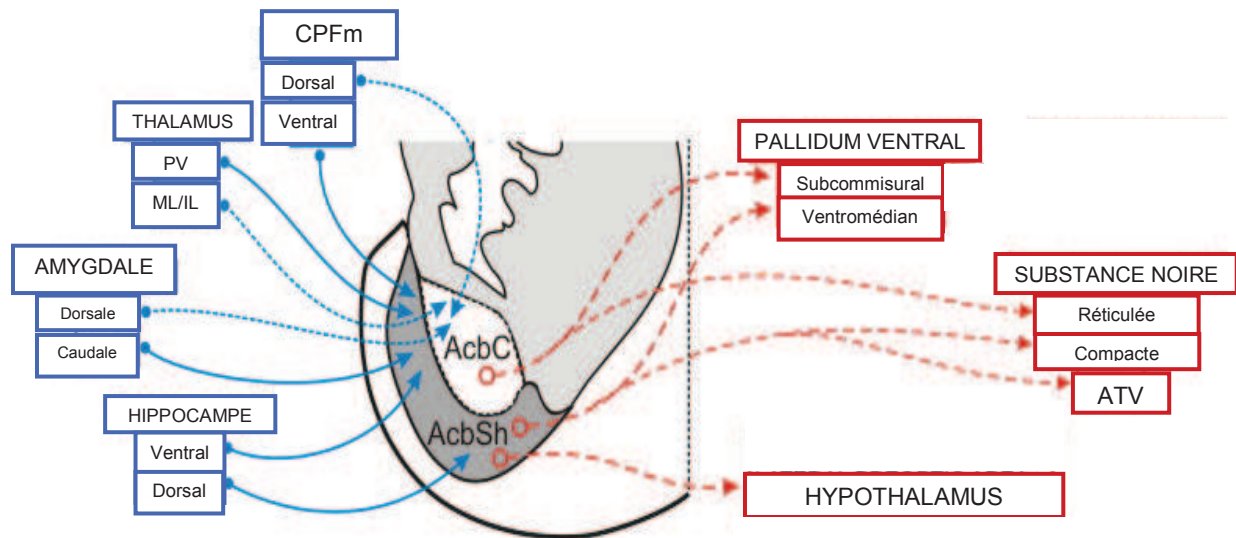


Figure 4. Le core et le shell du noyau accumbens. Principales afférences et efférences

(D'après Basar et al, 2010) (CPFm : Cortex Préfrontal médian, PV : Paraventriculaire, ML/IL : Médian/Intralatéral, ATV : Aire Tegmentale Ventrale, AcbC : noyau accumbens core, AcbSh : noyau accumbens shell)

ii. Intégration des informations à l'échelle du réseau

La libération de dopamine dans le noyau accumbens par les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale, doit être régulée et maintenue dans des constantes physiologiques. Pour cela, le noyau accumbens exerce une activité de régulation sur l'aire tegmentale ventrale. D'une part, il effectue un rétrocontrôle négatif sur les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale, grâce à des collatérales d'axone des MSNs GABAergiques du noyau accumbens shell. D'autre part, une des principales cibles des axones des MSNs est le pallidum ventral, qui lui-même est un des principaux inhibiteurs de l'activité des neurones de l'aire tegmentale ventrale. Le noyau accumbens peut donc activer indirectement les neurones dopaminergiques en levant l'inhibition exercée par le pallidum ventral sur l'aire tegmentale ventrale (Floresco et al, 2001).

En plus d'être le lieu des terminaisons dopaminergiques du système du plaisir, le noyau accumbens est à l'interface du système limbique et du système moteur. C'est le lieu où les émotions émanant du système limbique via le shell, sont confrontées au contrôle moteur par le core et traduites en un comportement approprié par le système moteur. A plus grande échelle, le noyau accumbens est le lieu d'intégration des informations motivationnelles (aire tegmentale ventrale), d'éveil (thalamus),

émotionnelles (amygdale), contextuelles (hippocampe), exécutives et cognitives (cortex préfrontal médian). Il est à son tour connecté, par des voies directes ou indirectes, via le pallidum ventral ou la substance noire, à des structures impliquées dans les fonctions basiques de survie (hypothalamus latéral), dans la motivation (aire tegmentale ventrale), dans la locomotion (Striatum), et dans les fonctions exécutives (cortex préfrontal médian et Thalamus). L'ensemble des informations afférentes au noyau accumbens y sont donc confrontées et traduites en comportements adaptés aux conditions environnementales (Groenewegen et al, 2007).

iii. Intégration des informations à l'échelle synaptique

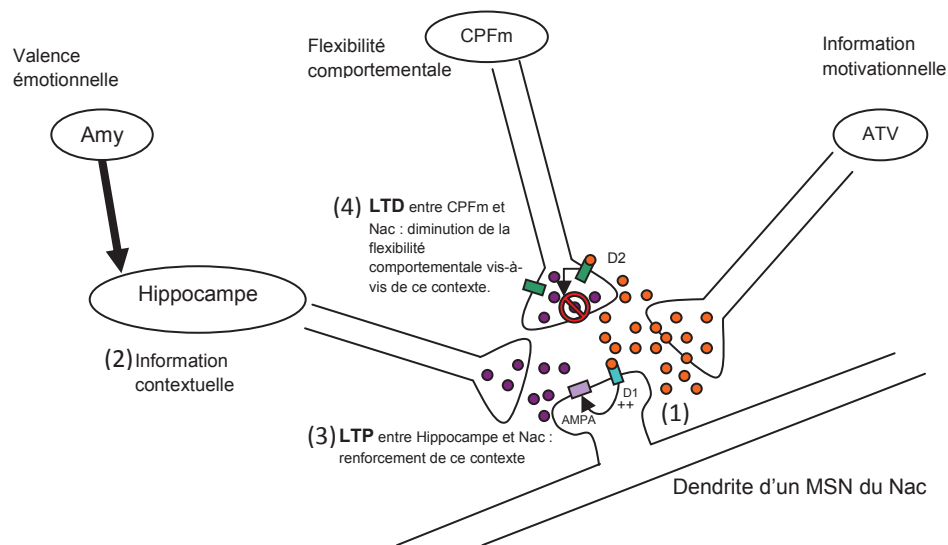
Dans le noyau accumbens, les épines dendritiques des MSNs GABAergiques peuvent être la cible de trois types d'éléments présynaptiques : les afférences dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale, les afférences glutamatergiques de l'hippocampe et celles du cortex préfrontal médian (figure 5). Cette convergence de trois synapses permet de confronter les informations contextuelles de l'hippocampe et exécutives du cortex préfrontal médian et de les moduler par l'information motivationnelle dopaminergique en provenance de l'aire tegmentale ventrale.

Ainsi, en cas de renforcement positif dans un contexte précis (figure 5a), une forte libération de dopamine par les afférences de l'aire tegmentale ventrale (figure 5a. (1)) est associée à l'activation des afférences glutamatergiques de l'hippocampe par le contexte (figure 5a. (2)). Ceci conduit à la mise en place d'une potentialisation à long terme (LTP) au niveau de la synapse hippocampe-noyau accumbens (figure 5a. (3)) et donc à l'enregistrement d'un renforcement positif contextuel. Simultanément une dé-potentialisation à long terme (LTD) a lieu dans la synapse cortex préfrontal médian-noyau accumbens pour la diminution de l'inhibition exécutive du cortex préfrontal médian (figure 5a. (4)). Le contexte associé au plaisir est renforcé et le contrôle exécutif s'oriente vers la recherche d'expérimenter de nouveau ce plaisir.

Dans le cas contraire, une situation aversive (figure 5b.) provoque un défaut de dopamine dans le noyau accumbens (figure 5b. (1)), qui conduit à une LTD de la synapse hippocampe-noyau accumbens (figure 5b. (2)) et à une LTP de la synapse cortex préfrontal médian-noyau accumbens (figure 5b. (3)). Il en résulte l'encodage d'une aversion pour le contexte et cela favorise la flexibilité comportementale et la recherche de nouvelles stratégies exécutives (Sesack et Grace, 2010).

Le système dopaminergique est également impliqué dans la transmission glutamatergique via ses récepteurs. La libération de glutamate est dépendante de l'activité des récepteurs D2 pré synaptiques (D2s) présents sur les afférences glutamatergiques (Centonze et al, 2004) et l'activité des D1 est impliquée dans la plasticité neuronale au niveau post synaptique, notamment par l'interaction avec les récepteurs AMPA (Beurrier et Malenka, 2002).

a. Plasticité synaptique induite en cas de contexte induisant un **renforcement positif**



b. Plasticité synaptique induite en cas de contexte induisant un **renforcement négatif**

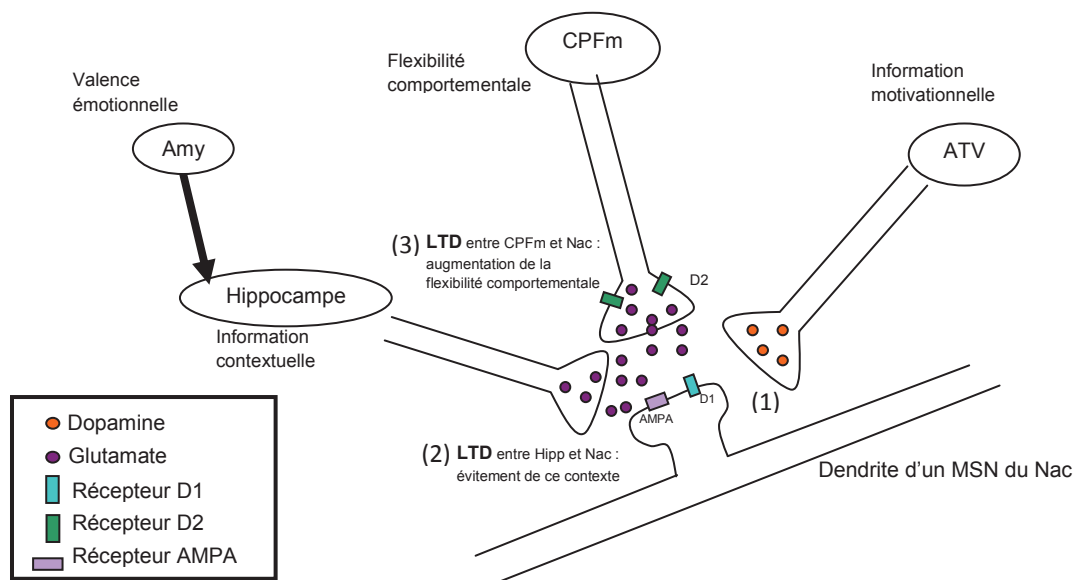


Figure 5. Schéma de l'intégration des informations dopaminergiques et glutamatergiques à l'échelle synaptique dans le noyau accumbens.

(D'après Sesack et Grace, 2010. ATV : aire tegmentale ventrale, CPFm : cortex préfrontal médian, Amy : amygdale, LTP : *long term potentiation*, LTD : *long term depression*)

c. L'aire Tegmentale Ventrale région de corps cellulaires dopaminergiques

Il existe deux voies dopaminergiques majeures dans le cerveau, d'une part, la voie nigro-striée dont les corps cellulaires sont dans la substance noire et projettent leurs axones vers le striatum dorsal (ou Caude Putamen chez le rat). Cette voie est impliquée dans les régulations motrices. D'autre part, la

voie mésocorticolimbique dont les corps cellulaires se trouvent dans l'aire tegmentale ventrale est impliquée dans les renforcements et la motivation (Wise 2004) (voir figure 6). Les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale jouent un rôle central dans le système de la récompense puisque ce sont eux qui produisent la dopamine à l'origine de la sensation du plaisir libérée dans le noyau accumbens. Leur activité est régulée par de nombreuses afférences au niveau de leurs corps cellulaires mais aussi au niveau de leurs terminaisons dans le cortex préfrontal et le noyau accumbens.

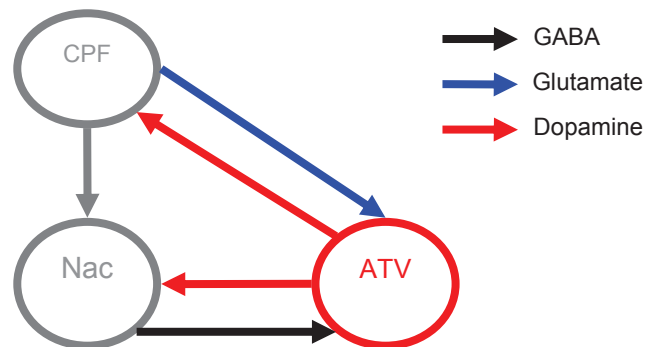


Figure 6. Principales connexions de l'aire tegmentale ventrale dans le système mésocorticolimbique.

(CPF : Cortex préfrontal, ATV, Aire tegmentale ventrale, Nac : Noyau accumbens).

L'aire tegmentale ventrale est une structure médiane du mésencéphale, formée de 60 à 65% de corps cellulaires dopaminergiques, de 30 à 35 % d'interneurones GABAergiques et de 2-3% de neurones glutamatergiques (Nair-Roberts et al, 2008). Les neurones dopaminergiques possèdent des propriétés de pacemaker assurant une activité basale constante de ces neurones, par des décharges spontanées (Grace et Onn, 1989). Cette activité spontanée est régulée par des potentiels post synaptiques inhibiteurs (IPSPs) réguliers des interneurones GABA (Grace et Bunney, 1985).

L'aire tegmentale ventrale émet ses projections dopaminergiques vers plusieurs structures telles que les tubercules olfactifs, l'amygdale, l'hippocampe mais surtout le cortex préfrontal médian et le noyau accumbens. Les neurones sont répartis dans l'aire tegmentale ventrale selon leurs propriétés métaboliques et électriques et les structures cibles de leurs efférences (revue : Sesack et Grace, 2010). Ainsi les neurones aux propriétés de décharge rapide projettent vers le noyau accumbens core, le noyau accumbens shell médian, le cortex préfrontal et le noyau basolatéral de l'amygdale, tandis que les neurones aux propriétés de décharge lente projettent plutôt vers le noyau accumbens shell latéral et le striatum dorsal (Lammel et al, 2008).

d. Les afférences glutamatergiques

En plus de la dopamine, le glutamate est très présent dans le système de la récompense. Il joue un rôle important pour l'intégration d'informations corticales et limbiques et pour la régulation de la plasticité synaptique de ce système. Il provient majoritairement d'afférences du cortex préfrontal (figure 7), une des trois structures majeures du système mésocorticolimbique (figure 1.), mais aussi de certaines structures limbiques et subcorticales.

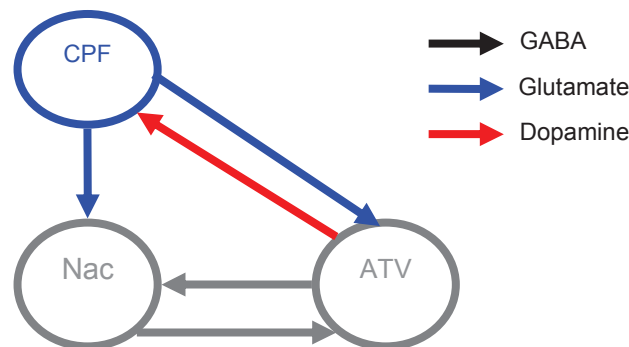


Figure 7. Principales connexions du cortex préfrontal dans le système mésocorticolimbique.

(CPF : Cortex préfrontal, ATV, Aire tegmentale ventrale, Nac : Noyau accumbens).

i. Les afférences glutamatergiques du Cortex Préfrontal médian

Le cortex préfrontal est une structure corticale impliquée dans de nombreuses fonctions cognitives supérieures, comme le contrôle exécutif, le changement de règle ou l'inhibition de réponse. C'est la seule zone corticale qui reçoit et envoie des informations vers les systèmes neuromodulateurs, notamment via sa partie médiane formée des aires prélimbiques et infralimbiques. Il est constitué à 85% de neurones pyramidaux glutamatergiques, les 15% restants étant des interneurons GABA inhibiteurs.

Les projections des neurones pyramidaux glutamatergiques excitateurs du cortex préfrontal médian, font leurs synapses avec les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale qui projettent eux-mêmes de nouveau vers le cortex préfrontal médian, formant une boucle d'activation réciproque entre les deux structures (Carr et Sesack, 2000).

Au niveau du noyau accumbens, les projections sont régionalisées de façon dorso-ventrale (voir figure 8) : le core reçoit des afférences provenant préférentiellement du cortex préfrontal médian dorsal (du cortex cingulaire antérieur et de l'aire prélimbique dorsale), tandis que les projections vers le shell proviennent du cortex préfrontal médian ventral (de l'aire prélimbique ventrale et de l'aire

infralimbique) (Berendse et al, 1992 ; Brog et al, 1993 ; Shirayama et Chaki, 2006 ; Ikemoto, 2007, Kalivas, 2009).

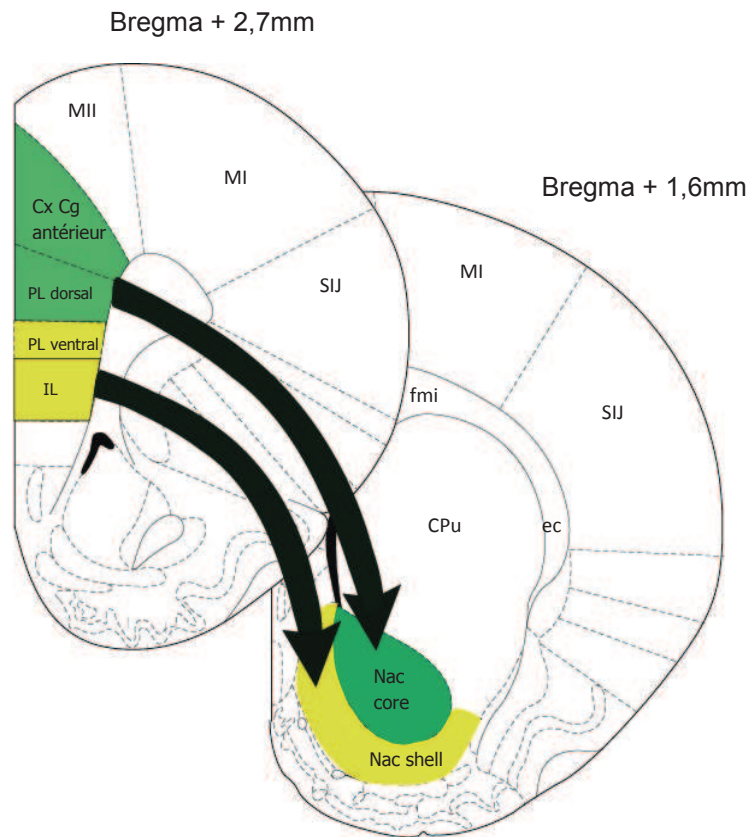


Figure 8. Projections régionalisées du cortex préfrontal médian vers le noyau accumbens chez le rat.

La partie dorsale du CPFm, constituée du cortex cingulaire antérieur et du prélimbique dorsal, projette préférentiellement vers le core du noyau accumbens tandis que la partie ventrale du CPFm, constituée du prélimbique ventral et de l'infralimbique, projette principalement vers le shell du noyau accumbens.

D'après l'atlas pour rat de Paxinos et Watson, 1986. Coupes coronales, coordonnées bregma antérieur +2.7mm et +1.6mm. (Légende : Cx Cg : Cortex Cingulaire, PL : cortex Prélimbique, IL : Cortex Infralimbique, Nac : Noyau Accumbens, MII : cortex moteur secondaire, MI : cortex moteur primaire, SIJ : cortex somatosensoriel primaire, fmi : forceps mineur du corps calleux, ec : capsule externe)

ii. Les afférences glutamatergiques limbiques et subcorticales

L'hippocampe qui est chargé de l'information spatiale, contextuelle et mnésique et le noyau basolatéral de l'amygdale, chargé de l'information affective et des associations conditionnelles, sont deux structures limbiques reliées au système mésocorticolimbique. Elles sont constituées de neurones pyramidaux glutamatergiques, qui projettent vers le core et le shell du noyau accumbens ainsi que vers le cortex préfrontal. Ces structures reçoivent également des afférences du noyau accumbens et du cortex préfrontal médian et sont connectées entre elles, ce qui forme des boucles

de connexions réciproques entre les structures limbiques et le système mésocorticolimbique (Brog et al, 1993).

L'aire tegmentale ventrale n'est pas la cible directe de ces structures et leur influence sur les neurones dopaminergiques s'exerce via le noyau accumbens et le cortex préfrontal médian. En revanche, elle reçoit des projections glutamatergiques de plusieurs structures subcorticales dont l'hypothalamus latéral et médian, la substance grise périaqueducale, le pallidum ventral ou encore le tegmentum dorsolatéral et le pédonculopontin. Ces afférences glutamatergiques subcorticales font leurs synapses avec les neurones dopaminergiques projetant vers le noyau accumbens (Mena-Segovia et al, 2008). Les structures glutamatergiques qui émettent des efférences vers les neurones mésolimbiques sont également interconnectées entre elles, et régulent de façon intégrée l'activité des neurones dopaminergiques (Geisler et Zahm, 2005) (figure 9).

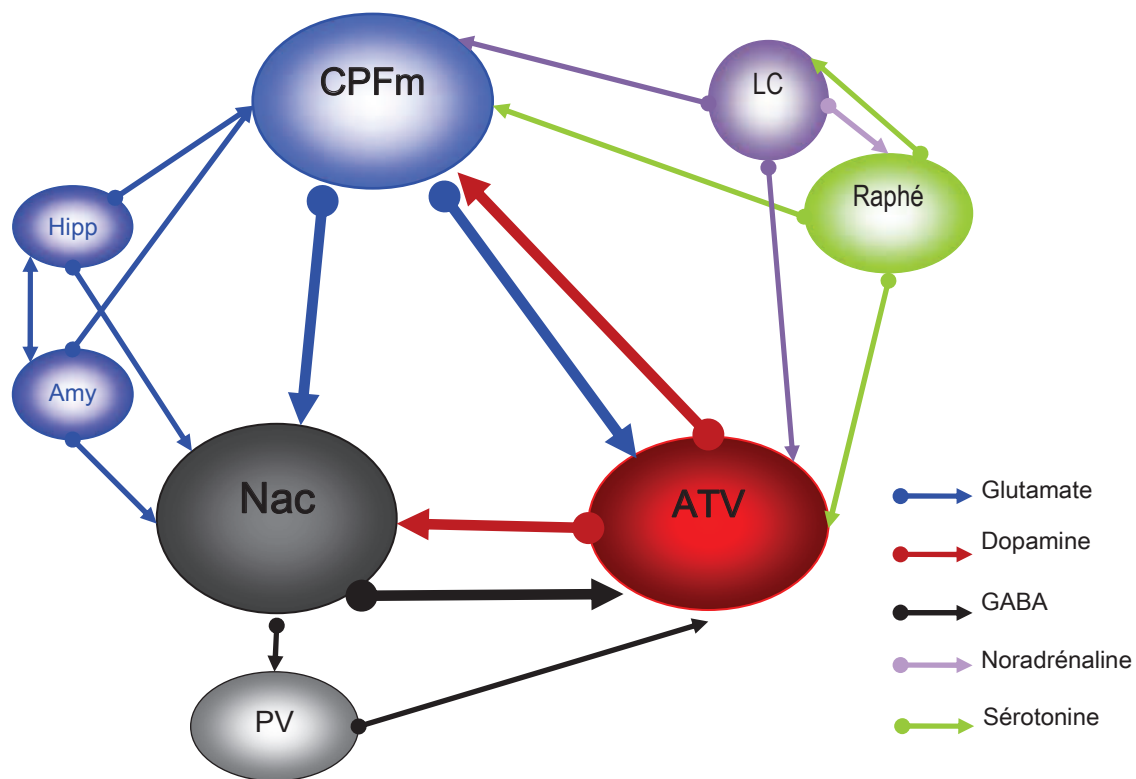


Figure 9. Principales structures émettant des afférences vers le système mésocorticolimbique.

(CPFm : cortex préfrontal médian, ATV : Aire tegmentale ventrale, Nac : Noyau Accumbens, PV, Pallidum Ventral, Hipp : Hippocampe, Amy : Amygdale, LC : Locus Coeruleus, Raphé : Noyau du Raphé)

3. Conclusion

Le système mésocorticolimbique ou système de la récompense, est constitué de trois structures (l'aire tegmentale ventrale et ses neurones dopaminergiques, le cortex préfrontal médian et ses neurones glutamatergiques et le noyau accumbens pour l'intégration de ces informations) en interaction par des boucles de régulation réciproques directes ou indirectes (voir figure 9). Il est responsable de l'encodage d'informations motivationnelles et exécutives grâce à l'interprétation de stimulations renforçantes et contextuelles. Le maintien de l'équilibre homéostatique de ce système est essentiel pour la régulation du comportement dirigé vers une cible d'un individu. La dérégulation de ce système par une perturbation au niveau d'une des structures ou d'une des boucles de régulation conduit à des adaptations complexes et étendues à l'ensemble du système et aux structures en interaction.

Chapitre II : Etat des connaissances sur la neurobiologie de la cocaïne

1. Les effets d'une prise aiguë de cocaïne.

a. Les effets d'une prise aiguë de cocaïne sur la dopamine.

La cocaïne est un inhibiteur de la recapture des catécholamines. Elle se fixe sur les transporteurs à la dopamine (DAT), à la sérotonine, (SERT) et à la noradrénaline (NET) qui se trouvent sur la membrane plasmique neuronale (Kuhar et al, 1991). Ces transporteurs sont chargés de capturer les catécholamines extracellulaires et de les ramener vers le milieu intracellulaire présynaptique, afin de réguler leur concentration au niveau de la fente synaptique. L'inhibition de l'activité des transporteurs par la cocaïne provoque une augmentation exacerbée de ces neurotransmetteurs dans l'espace extracellulaire des structures cibles des neurones catécholaminergiques comme le striatum, le noyau accumbens et le cortex préfrontal (voir le mécanisme figure 10).

L'injection de cocaïne chez des rats naïfs provoque une augmentation rapide de dopamine dans le Striatum et particulièrement dans le noyau accumbens qui atteint son maximum après 20 minutes. Cette augmentation de dopamine dans le noyau accumbens est concomitante avec une augmentation de l'activité locomotrice (Kalivas & Duffy, 1993a).

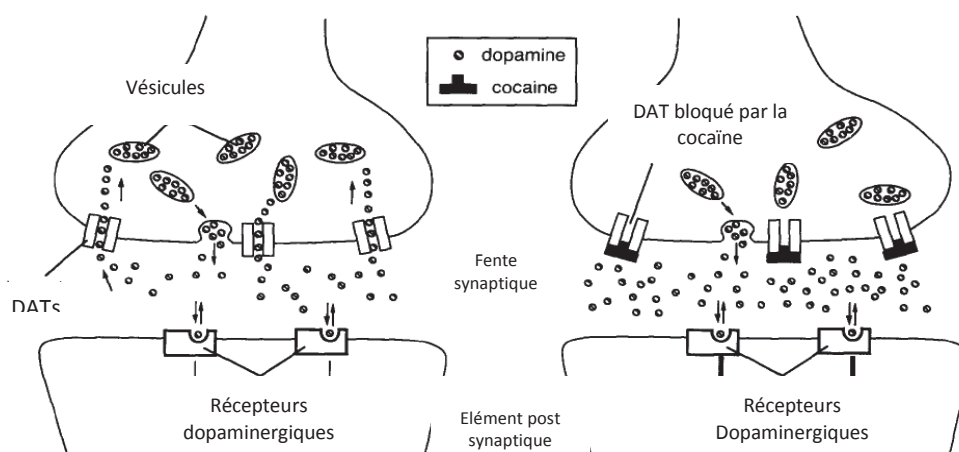


Figure 10. Effet d'une prise aiguë de cocaïne sur la dopamine.

La cocaïne se fixe sur le transporteur à la dopamine (DAT) et bloque la recapture de la dopamine dans la voie mésocorticolimbique. Ceci potentialise la neurotransmission dopaminergique et induit un plaisir et une euphorie intenses (d'après Kuhar et al, 1991)

L'augmentation exacerbée de la dopamine est une étape clé pour la mise en place d'adaptations plus complexes conduisant à la dépendance. En effet, elle est également observée pour les autres substances addictives (les opiacés, l'alcool, la nicotine et les autres psychostimulants comme l'amphétamine) (Di Chiara et Imperato, 1988), bien que leur cible pharmacologique initiale ne soit pas directement la dopamine.

b. Les effets d'une prise aiguë de cocaïne sur le glutamate.

L'action pharmacologique initiale de la cocaïne ne cible pas directement le système glutamatergique. Plusieurs études ne constatent pas de modification des taux de glutamate dans le noyau accumbens après une injection aiguë de cocaïne (Pierce et al, 1996 ; Fitzgerald et al, 1996). Il a cependant été rapporté que l'administration de fortes doses de cocaïne en aiguë pouvait entraîner une augmentation de glutamate dans les structures du système mésocorticolimbique (cortex préfrontal médian et noyau accumbens) mais pas dans les structures extrapyramidales tel que le striatum (Smith et al, 1995 ; Reid et al, 1997 ; Miguens et al, 2008). L'augmentation de glutamate observée uniquement après une injection de doses élevées de cocaïne pourrait donc être le résultat de perturbations en cascade dose-dépendantes, partant de l'effet inhibiteur de la recapture des catécholamines de la cocaïne et se répercutant sur le système glutamatergique.

2. Les effets d'une prise répétée de cocaïne.

L'action pharmacologique de la cocaïne induisant une augmentation exacerbée des catécholamines dans l'espace synaptique, provoque une très forte stimulation de l'ensemble des composantes des systèmes catécholaminergiques et notamment du système dopaminergique.

L'organisation du système nerveux central en réseau et l'interdépendance des différentes structures, permettent normalement de maintenir un équilibre homéostatique au niveau moléculaire, cellulaire, neurochimique et structurel. La prise de cocaïne provoque une amplification exacerbée de la neurotransmission dopaminergique qui, lorsqu'elle est répétée sur le long terme engendre des perturbations non seulement du système dopaminergique mais aussi de l'ensemble des systèmes en interaction (Noble, 2008).

a. Les effets d'une prise répétée de cocaïne sur le comportement.

L'administration répétée de cocaïne entraîne souvent une augmentation progressive et durable des effets renforçants de la drogue et de l'activation locomotrice, c'est la sensibilisation comportementale (Vanderschuren et Kalivas, 2000).

Cette adaptation comportementale est constituée principalement d'une augmentation de l'activité locomotrice au fur et à mesure des injections répétées de cocaïne mais aussi d'une augmentation des stéréotypies caractéristiques du comportement des animaux sous l'effet de psychostimulants (Mayfield et al, 1992 ; McCreary et Marsden, 1993). Les stéréotypies se manifestent par des mouvements courts et rapides de la tête allant de haut en bas (head-bobbings en anglais) et leur intensité est dépendante de la dose de cocaïne injectée (Cadoni et al, 1999).

Il a été décrit dans la littérature que la mise en place de la sensibilisation comportementale se ferait au cours de traitements répétées à la cocaïne. Elle a été observée après 3 jours (Kalivas et al, 1988) et 6 jours (Mayfield et al, 1992) d'injections répétées de cocaïne et jusqu'à après 14 jours (Unterwald et al, 1994 ; Burger-Martin-Iverson et al, 1994) et 18 jours de traitement (Roberston et al, 1990) chez le rat. Cette adaptation comportementale à la prise répétée de cocaïne est composée de deux phases appelées initiation et expression. La phase d'initiation fait référence aux modifications cellulaires et moléculaires transitoires qui se mettent en place en réponse à l'action pharmacologique de la cocaïne. La phase d'expression se met en place plus tardivement et est due à des adaptations neurobiologiques persistant à long terme. Cette dernière phase est établie après une période de sevrage et les modifications alors observées sont le résultat d'adaptions face à l'absence du produit préalablement consommé régulièrement (Kalivas et Stewart, 1991 ; Cornish et Kalivas, 2001).

Ces deux phases, en plus de se distinguer au niveau temporel, prennent place dans des structures anatomiques différentes. La phase d'initiation a lieu au niveau des corps cellulaires dopaminergiques car l'injection intracérébrale répétée de cocaïne directement dans l'aire tegmentale ventrale est capable d'induire une sensibilisation comportementale, ce qui n'est pas observé si les injections sont faites directement dans le noyau accumbens. La phase d'expression a, quant à elle, plutôt lieu au niveau des terminaisons des neurones dopaminergiques car une injection de cocaïne dans le noyau accumbens chez des rats ayant reçu des injections successives de cocaïne dans l'aire tegmentale ventrale, entraîne une sensibilisation comportementale (Henry et White, 1995).

Les études précliniques se sont intéressées à ce comportement chez le rongeur car il pourrait refléter l'hypersensibilité environnementale, notamment aux indices associés à la prise de drogue que ressentent les cocaïnomanes, qui se met en place de façon progressive et persiste même après plusieurs mois d'abstinence (Sax et Strakowski, 2012). De plus, les stéréotypies peuvent également

être comparées aux comportements stéréotypés effectués par les patients cocaïnomanes (Vorspan et al, 2012).

Le système dopaminergique en interaction avec le système glutamatergique forme un des principaux substrats de cette adaptation comportementale à des injections répétées de cocaïne (Cronish et Kalivas, 2012).

b. Les effets d'une prise répétée de cocaïne sur le système dopaminergique.

La prise répétée de cocaïne induit une hyper activation du système dopaminergique, entraînant des perturbations importantes sur le long terme au niveau neurochimique, cellulaire et moléculaire (Noble, 2008, Unterwald et al, 2001, Stuber et al, 2010). La dopamine jouant un rôle majeur dans la régulation des émotions et de la motivation, les altérations de sa neurotransmission ont des conséquences directes sur le comportement et la mise en place de l'addiction.

i. Modifications de la dopamine extracellulaire.

Les taux de base de dopamine extracellulaire, dans des conditions normales, doivent intervenir dans le maintien et la régulation de l'activité basale et homéostasique du système. La prise répétée de cocaïne entraînant des augmentations successives et exagérées de dopamine, conduit à la mise en place d'adaptations complexes de la neurotransmission dopaminergique et notamment à des modifications des taux de base extracellulaires (Tableaux 2, 3 et 4.).

Les structures dans lesquelles la dopamine extracellulaire a été mesurée après des administrations répétées de cocaïne sont le noyau accumbens (Parsons et al, 1991 ; Robertson et al, 1991 ; Rossetti et al, 1992a et 1992b ; Duvauchelle et al, 2000a ; Weiss et al, 1992a ; Heidbreder et Shippenberg, 1994 ; Heidbreder et al, 1996 ; Segal et Kuczenski, 1992 ; Kalivas et Duffy, 1993a ; McFarland et al, 2003), le striatum (Imperato et al, 1992b ; Maisonneuve et al, 1995) mais aussi l'aire tegmentale ventrale et la substance noire (Kalivas et Duffy, 1993b) et ceci après des sevrages pouvant aller de 1 jour jusqu'à 22 jours (Heidbreder et al, 1996). Cependant, l'ensemble de ces études utilisent des protocoles d'administration de cocaïne très différents. En effet, les doses utilisées dans ces différentes études vont de 10 à 45 mg/kg de cocaïne par jour, injectées en intrapéritonéal ou en intraveineuse (McFarland et al, 2003), pour des durées de traitements allant de 4 à 18 jours. Une étude utilise des doses beaucoup plus faibles (4.2mg/kg) mais les administrations se font en bolus intraveineuse (Duvauchelle et al, 2000a).

Il est difficile d'établir un consensus pour les conséquences d'une administration répétée de cocaïne sur les taux de dopamine extracellulaire. En effet, certaines études ont mis en évidence une

diminution des taux de dopamine (Parsons et al, 1991 ; Robertson et al, 1991 ; Rossetti et al, 1992a et 1992b ; Imperato et al, 1992b ; Maisonneuve et al, 1995 ; Duvauchelle et al, 2000a), d'autres une augmentation (Weiss et al, 1992a ; Kalivas et Duffy, 1993b ; Heidbreder et al, 1996) ou bien pas de modification (Segal et Kuczenski, 1992 ; Kalivas et Duffy, 1993a ; McFarland et al, 2003).

- Diminution des taux de dopamine extracellulaire

Une diminution des taux de base de dopamine extracellulaire (Tableau 2), a été mise en évidence par plusieurs auteurs dans le noyau accumbens (Parsons et al, 1991 ; Robertson et al, 1991 ; Rossetti et al, 1992a et 1992b ; Imperato et al, 1992b ; Duvauchelle et al, 2000a) et dans le striatum dorsal (Maisonneuve et al, 1995) avec des traitements impliquant plusieurs injections par jour (Rossetti et al, 1992a et 1992b ; Imperato et al, 1992b ; Maisonneuve et al, 1995) ou une seule injection mais avec de fortes doses (20mg/kg : Parsons et al, 1991, 30mg/kg : Robertson et al, 1991). Cette déplétion dopaminergique a pu être observée dans le noyau accumbens au cours d'administrations répétées de cocaïne par voie intrapéritonéale (Imperato et al, 1992b). Après un jour de sevrage, une déplétion dopaminergique a été observée dans le striatum après un traitement par voie intrapéritonéale (Maisonneuve et al, 1995). Dans le noyau accumbens, un traitement par voie intrapéritonéale n'a pas entraîné de modification des taux de dopamine extracellulaires après un jour de sevrage (Parsons et al, 1991) et c'est après un traitement en intraveineuse qu'une déplétion a été observée dans cette structure (Duvauchelle et al, 2000a). Les diminutions des taux de dopamine extracellulaire dans le noyau accumbens, après des traitements par voie intrapéritonéale n'ont été observées qu'après 3 jours de sevrage (Rossetti et al, 1992 a et 1992b) et jusqu'à 10 jours (Rossetti et al, 1992a ; Parsons et al, 1991). Une étude analysant les taux de dopamine après 15 jours de sevrage n'a pas vu de modification (Rossetti et al, 1992a).

Les auteurs de ces différentes études associent la déplétion dopaminergique à l'état émotionnel négatif et anhedonique caractéristique du sevrage (Imperato et al, 1992b ; Maisonneuve et al, 1995 ; Duvauchelle et al, 2000a). Au niveau mécanistique, ils expliquent cela par des compensations cellulaires des récepteurs dopaminergiques et font notamment l'hypothèse d'une augmentation de la densité ou de l'activité des DATs.

Pourtant, plusieurs travaux ne vont pas dans le sens de cette hypothèse car ils montrent qu'après un traitement de 10 jours avec 10mg/kg de cocaïne par jour en perfusion continue (avec deux jours d'arrêt tous les 5 jours), une diminution de la densité des DATs dans le noyau accumbens est observée. Celle-ci survient après au moins 3 jours de sevrage et est visible jusqu'à 60 jours (Pilotte et al, 1994 ; Pilotte et al, 1996). Ils observent également une diminution de ces transporteurs au niveau des corps cellulaires dopaminergiques dans l'aire tegmentale ventrale et la substance noire (Cerutti et al, 1994). De leur côté, Peris et collaborateurs (1990) qui utilisent un traitement par voie i.p. avec

des injections de cocaïne de 10mg/kg pendant 8 jours, ne voient pas de modification de la densité des DATs après un jour de sevrage (Peris et al, 1990). Il est donc difficile d'attribuer la déplétion de dopamine à une modification de la densité des DATs.

Néanmoins, il a été mis en évidence que l'activité de recapture de la dopamine était augmentée au niveau des terminaisons dopaminergiques *in vivo* (Missale et al, 1985, Ng et al, 1991) et *in vitro* (Daws et al, 2002), ce qui pourrait expliquer la déplétion dopaminergique fréquemment observée.

Une autre hypothèse énoncée par les auteurs pour expliquer la déplétion dopaminergique est celle d'une augmentation de la densité ou de la sensibilité des autorécepteurs inhibiteurs dopaminergiques D2 situés sur l'élément présynaptique (Maisonneuve et al, 1995). Cette hypothèse n'a pu être clairement confirmée à cause de la diversité de résultats observés pour la variation de la densité des récepteurs suite à des traitements répétés à la cocaïne (voir partie sur les modifications des récepteurs après un traitement répété à la cocaïne). Par ailleurs, c'est plutôt une hyposensibilisation des récepteurs D2-like qui a été mise en évidence (Nestler et al, 1990, Henry et al, 1995), ce qui va à l'encontre d'une diminution de la libération de dopamine.

Tableau 2. Etudes rapportant une diminution des taux de base de dopamine extracellulaire

Diminution	Profil d'administration utilisé	Structure	Moment d'observation
<i>Parsons et al, 1991</i>	20 mg/kg i.p. par jour pendant 10 jours	Nac	+ 10 jours mais pas à +1 jour de sevrage
<i>Robertson et al, 1991</i>	30mg/kg i.p. par jour pendant 18 jours.	Nac	+ 7 jours de sevrage
<i>Rossetti et al, 1992a</i>	15 mg/kg i.p. 2 fois par jour pendant 16jours	Nac	+ 3, + 5 et + 10 jours de sevrage Retour à des taux normaux à +15 jours
<i>Rossetti et al, 1992b</i>	15 mg/kg i.p. 2 fois par jour pendant 18 jours	Nac	+ 3 et + 5 jours de sevrage
<i>Imperato et al, 1992b</i>	10mg/kg i.p. 2 fois par jour pendant 9 jours	Striatum ventral (Nac)	Pendant les derniers jours de traitement (j6 à j9) + 7 jours de sevrage
<i>Maisonneuve et al, 1995</i>	10 ou 15 mg/kg i.p. 3 fois par jour pendant 13 jours	Striatum ventromédian et dorsolatéral	+ 1 jour de sevrage
<i>Duvauchelle et al, 2000a</i>	4.2 mg/kg i.v. pendant 6 jours	Nac	+ 1 jour de sevrage

Nac : noyau accumbens

- Augmentation des taux de dopamine extracellulaire :

Malgré les nombreuses études rapportant une diminution des taux de dopamine extracellulaire, il a été montré que des traitements répétés à la cocaïne pouvaient également entraîner une augmentation de la dopamine extracellulaire dans le noyau accumbens (Weiss et al, 1992a ; Heidbreder et Shippenberg, 1994 ; Heidbreder et al, 1996) ou au niveau des corps cellulaires dopaminergiques dans l'aire tegmentale ventrale et la substance noire (Kalivas et Duffy, 1993b) (Tableau 3). Ces résultats sont observés après des traitements d'une durée de 3 jours (Heidbreider et Shippenberg, 1994), 5 jours (Kalivas et Duffy, 1993b) ou 10 jours (Weiss et al, 1992a, Heidbreder et al, 1996).

Les auteurs de ces études font l'hypothèse que leurs résultats, en contradiction avec les autres travaux rapportés, s'expliqueraient par le fait que l'augmentation de dopamine soit transitoire. Ils associent les différentes variations de dopamine extracellulaire aux différentes phases de la dépendance, à savoir l'initiation ou l'expression (Kalivas et Duffy, 1993a). En effet l'augmentation de la dopamine extracellulaire est observée dès un jour de sevrage et jusqu'à 3 jours de sevrage dans le noyau accumbens (Weiss et al, 1992a) mais ne persiste pas après 7 jours (Weiss et al, 1992a) et 12 jours dans cette même structure (Heidbreder et al, 1996) ou 15 jours dans l'aire tegmentale ventrale et la substance noire (Kalivas et Duffy, 1993b). De plus, Heidbreder et collaborateurs montrent qu'après avoir augmenté, la dopamine diminue progressivement avec la durée du sevrage (Heidbreder et al, 1996). Ils suggèrent que l'augmentation de dopamine extracellulaire fasse partie des processus d'initiation de la dépendance et que cela devient une diminution lors de la phase d'expression (Weiss et al, 1992a). Cependant, cette hypothèse n'a pas encore pu être confirmée et des résultats opposés ont été rapportés à des temps de sevrages similaires (+ 1 jour), (Maisonneuve et al, 1995 ; Weiss et al, 1992a).

Les auteurs observant une augmentation de la dopamine extracellulaire émettent également l'hypothèse que l'augmentation dopaminergique serait due à des profils d'administration avec des doses moins fortes et des durées moins longues que ceux pour lesquels une déplétion a été observée (Weiss et al, 1992a). Pourtant, une augmentation des taux de base de dopamine est observée après des traitements en i.p. de doses allant de 20 mg/kg (Heidbreider et Shippenberg, 1994 ; Heidbreder et al, 1996) à 30 mg/kg par jour (Weiss et al, 1992a ; Kalivas et Duffy, 1993b) en une seule injection, ce qui est comparable aux traitements de Parsons et collaborateurs (1991) ou Robertson et collaborateurs (1991) qui voient une déplétion dopaminergique.

Bien que les auteurs aient un regard critique sur leurs résultats montrant une augmentation de la dopamine, l'augmentation des taux de dopamine extracellulaire serait en accord avec l'hyposensibilisation des autorécepteurs inhibiteurs D2, décrite lors des phases d'initiation de la dépendance (Henry et White, 1991 ; Beurrier et Malenka, 2000) et la diminution de la densité de

DATs, décrite précédemment et observée après un traitement répété à la cocaïne (Pilotte et al, 1994 et 1996 ; Cerutti et al, 1994).

Tableau 3. Etudes rapportant une augmentation des taux de base de dopamine extracellulaire

Augmentation	Profil d'administration utilisé	Structure	Moment d'observation
<i>Weiss et al, 1992a</i>	30 mg/kg i.p. par jour pendant 10 jours	Nac	+ 1, + 3 jours de sevrage Retour à des taux normaux à + 7 jours
<i>Kalivas et Duffy, 1993b</i>	15mg/kg à j1 puis 30 mg/kg i.p. par jour pendant 5 jours	ATV et SN	+ 1 jour de sevrage Retour à des taux normaux à + 15 jours
<i>Heidbreder et Shippenberg, 1994</i>	20 mg/kg i.p. par jour pendant 3 jours	Nac	+ 2 jours de sevrage
<i>Heidbreder et al, 1996</i>	20 mg/kg i.p. par jour pendant 10 jours	Nac	+ 2 jours de sevrage Retour à des taux normaux après 12 et 22 jours

(Nac : Noyau accumbens, ATV : aire tegmentale ventrale, SN : substance noire)

- Absence de modification des taux de dopamine extracellulaire:

Quelques études n'ont pas mis en évidence de modifications de la dopamine extracellulaire dans le noyau accumbens, suite à des administrations répétées de cocaïne par voie intrapéritonéale après 1, 2 ou 14 jours de sevrage (Segal et Kukzenski 1992 ; Kalivas et Duffy, 1993a) ou bien suite à des administrations en i.v. de doses similaires à de l'autoadministration (McFrand et al, 2003) (Tableau 4). Ceci est peut-être dû au fait que ces traitements étaient de courtes durées (4 jours pour Segal et Kukzenski 1992 et 5 jours pour Kalivas et Duffy, 1993a) mais nous avons vu précédemment qu'un traitement d'une durée de 3 jours avait suffi à provoquer une augmentation de la dopamine extracellulaire dans le noyau accumbens (Heidbreder et Shippenberg, 1994).

Tableau 4. Etudes ne rapportant pas de modification des taux de base de dopamine extracellulaire

Pas de modification	Profil d'administration utilisé	Structure	Moment d'observation
<i>Segal et Kuczenski, 1992</i>	10 mg/kg i.p. par jour pendant 4 jours	Nac	+ 2 jours de sevrage
<i>Kalivas et Duffy, 1993a</i>	15mg/kg à j1 puis 30 mg/kg i.p. par jour pendant 5 jours	Nac	+1 et +14 jours de sevrage
<i>McFarland et al, 2003</i>	Administration de doses équivalentes à des rats en autoadministration (environ 20.5mg/kg par jour en i.v.)	Nac core	+ 24 heures

(Nac : noyau accumbens)

- Conclusions et Interprétation :

La littérature actuelle ne permet pas pour le moment de faire un consensus sur les conséquences d'une prise répétée de cocaïne sur les taux basaux de dopamine extracellulaire à cause d'une grande disparité dans les résultats. Toutefois l'ensemble de ces études s'accordent à dire que le profil d'administration, la durée, l'intensité et la quantité de cocaïne administrée ont une grande importance pour les modifications des taux de base de dopamine extracellulaire (Weiss et al, 1992a, Maisonneuve et al, 1995), ce qui pourrait expliquer cette grande diversité de résultats.

ii. Modifications des récepteurs dopaminergiques.

La cocaïne stimule indirectement les récepteurs dopaminergiques via l'augmentation de dopamine extracellulaire par l'inhibition de sa recapture. Sur le long terme, une exposition répétée à la cocaïne entraîne des modifications des récepteurs dopaminergiques, induisant des perturbations de la neurotransmission. Ces récepteurs sont impliqués dans la mise en place et dans les conséquences comportementales d'une prise répétée de cocaïne (McCreary & Madsen, 1993).

1. Modifications de la densité des récepteurs dopaminergiques.

Plusieurs travaux ont étudié la variation de la densité des récepteurs dopaminergiques en conséquence à un traitement répété à la cocaïne. Ils montrent que les récepteurs D1-like (Tableaux 5 et 6.) et D2-like (Tableaux 7 et 8.) peuvent être modifiés dans le noyau accumbens (Kleven et al, 1990 ; Peris et al, 1990 ; Unterwald et al, 1994 et 2001), dans le striatum (Kleven et al, 1990 ; Tsukada et al, 1996 ; Zeigler et al, 1991 ; Unterwald et al, 1994 ; Sousa et al, 1999 ; Stanwood et al, 2000), dans le cortex préfrontal (Kleven et al, 1990 ; Zeigler et al, 1991) et dans la substance noire (Zeigler et al, 1991 ; Unterwald et al, 1994). Aucune variation n'a été observée dans l'aire tegmentale

ventrale (Unterwald et al, 1994). Plusieurs résultats différents ont été rapportés quant à l'intensité et au sens de la variation, en conséquence aux différents traitements présents dans la littérature.

- Modification des D1-like dans la voie mésocorticolimbique :

La voie mésocorticolimbique est fortement altérée après une administration répétée de cocaïne et notamment dans la régulation des récepteurs D1-like (Tableau 5).

Aucune modification n'a été observée jusqu'à maintenant dans l'aire tegmentale ventrale. Cependant, au niveau des terminaisons dopaminergiques dans le noyau accumbens, plusieurs résultats ont été rapportés. Une diminution des récepteurs D1-like a été observée 20 minutes après la dernière injection d'un traitement répété à la cocaïne de 10 jours (Kleven et al, 1990). Contrairement à ce résultat, c'est une augmentation de ces récepteurs qui a été observée suite à des traitements de 14 jours, lorsqu'une dose quotidienne de 30 mg/kg de cocaïne est injectée en deux ou trois injections par jour mais pas lorsqu'elle est injectée en une seule fois (Unterwald et al, 1994, 2001).

Des traitements plus courts (de 2 à 8 jours) (Peris et al, 1990 ; Mayfield et al, 1992, Unterwald et al, 1994) ou des traitements pour lesquels les analyses ont été faites après des temps de sevrage prolongés (+7 jours : Peris et al, 1990 ; +14 jours : Kleven et al, 1990 ; +30 jours : Zeigler et al, 1991), n'ont pas entraîné de modification des D1-like dans le noyau accumbens. Ceci montre que ces variations seraient transitoires car elles ne se mettent en place qu'après une durée de traitement prolongé et ne persistent pas après au moins une semaine de sevrage. Il semblerait également que l'administration de cocaïne en diffusion continue n'ait pas d'effet sur les récepteurs D1-like dans le noyau accumbens car aucune variation n'a été observée après 1 jour (Kunko et al, 1998) ou 30 jours de sevrage (Zeigler et al, 1991).

Les récepteurs D1-like sont également modifiés dans le cortex préfrontal. Leur densité est augmentée après 15 jours de traitement, 20 minutes après la dernière injection pour des doses journalières de 20mg/kg mais pas 10 mg/kg (Kleven et al, 1990). Après 14 jours de sevrage, il semblerait que des régulations entraînent une diminution de leur densité dans le cortex préfrontal (Kleven et al, 1991) qui reviendrait à des taux normaux après 30 jours de sevrage (Zeigler et al, 1991).

Tableau 5. Variation de la densité des récepteurs dopaminergiques D1-like dans la voie mésocorticolimbique

D1-like	Variation observée	Temps après la dernière injection	Publication - Traitement effectué
ATV	=	+ 30min	<i>Untrewald et al, 1994</i> – 15 mg/kg i.p. 3 fois par jour pendant 2,7 ou 14 jours.
Nac	↓	+20 min	<i>Kleven et al, 1990</i> – 10 mg/kg i.p. par jour pendant 15j
	↑	+30 min	<i>Untrewald et al, 1994</i> – 15mg/kg i.p.3 fois par jours pendant 14 jours
		+30 min	<i>Untrewald et al, 2001</i> – 30mg/kg i.p. par jour en 2 ou 3 injections pendant 14 jours
	=	+ 30min	<i>Untrewald et al, 1994</i> – 15 mg/kg i.p. 3 fois par jour pendant 2 ou 7 jours. <i>Unterwald et al, 2001</i> - 30 mg/kg i.p. par jour pendant 14 jours
		+1 jour	<i>Kunko et al, 1998</i> – 1µl/heure en continu (minipompes sous cutanées pendant 7 jours (soit 15,30 ou 50µg/kg par jour)
		+1 jour +7 jours	<i>Peris et al, 1990</i> – 10 mg/kg i.p. par jour pendant 8 jours
		+ 7jours	<i>Myafield et al, 1992</i> – 15mg /kg i.p. par jour pendant 6 jours
		+14 jours	<i>Kleven et al, 1990</i> – 10 mg/kg i.p. par jour pendant 15j
		+ 30 jours	<i>Zeigler et al, 1991</i> – environ 20mg/kg par jour en diffusion continue ou en injection s.c. pendant 5 jours
CPF	↓	+ 14 jours	<i>Kleven et al, 1990</i> – 10 ou 20 mg/kg par jour pendant 15j
	↑	+ 20 min	<i>Kleven et al, 1990</i> – 20 mg/kg par jour pendant 15j
	=	+ 20 min	<i>Kleven et al, 1990</i> – 10 mg/kg par jour pendant 15j
		+ 30 jours	<i>Zeigler et al, 1991</i> – environ 20mg/kg par jour en diffusion continue ou en injection s.c. pendant 5 jours

- Modifications des D1-like dans la voie nigrostriée :

Des modifications de la densité des récepteurs D1-like ont également été mises en évidence dans la voie dopaminergique nigrostriée (Tableau 6).

Dans la substance noire, Unterwald et collaborateurs montrent que les D1-like sont diminués 30 minutes après la fin d'un traitement répété à la cocaïne ayant duré 7 jours ou 14 jours mais pas 2 jours (Unterwald et al, 1994).

Dans le striatum, plusieurs études montrent que les D1-like sont diminués après des traitements longs allant de 7 à 15 jours (Kleven et al, 1990 ; Tsukada et al, 1996 ; Stanwood et al, 2000). Cette modification semble robuste car elle est observée malgré les différences de protocoles d'administration des différentes études. En effet, celles-ci utilisent des doses allant de 10 mg/kg (Kleven et al, 1990) à 45 mg/kg (Tsukada et al, 1996) par jour, administrées en intrapéritonéal en une fois (Kleven et al, 1990) ou en 3 fois (Tsukada et al, 1996) ou en sous cutanée en diffusion lente et continue (Stanwood et al, 2000). De plus les observations sont faites entre 20 minutes et 14 jours après la dernière injection de cocaïne (Kleven et al, 1990). Quelques études n'ont pas réussi à mettre en évidence ces modifications dans le striatum. Ces dernières utilisent des traitements plus courts que ceux décrits précédemment (5 à 7 jours contre 7 à 15 jours), ce qui pourrait peut-être expliquer l'absence de variation de la densité des D1-like (Zeigler et al, 1991 ; Kunko et al, 1998 ; Sousa et al, 1999).

Tableau 6. Variation de la densité des récepteurs dopaminergiques D1-like dans la voie nigrostriée

D1-like	Variation observée	Temps après la dernière injection	Publication - Traitement effectué
SN	↑	+ 30min	Untrewald et al, 1994 – 15 mg/kg i.p. 3 fois par jour pendant 7 et 14 jours.
	=	+ 30min	Untrewald et al, 1994 – 15 mg/kg i.p. 3 fois par jour pendant 2 jours.
Striatum dorsal	↓	+ 20 min + 14 jours	Kleven et al, 1990 – 10 ou 20 mg/kg i.p. par jour pendant 15j
		+ 1 heure + 3.5 heures	Tsukada et al, 1996 – 15mg/kg,i.p. 3 fois par jours pendant 7 ou 14 jours.
		+24h	Stanwood et al, 2000 – 20mg/kg s.c. par jour en diffusion continue pendant 14 jours
	=	+ 1 jour	Kunko et al, 1998 – 1µl/heure en continu (minipompes sous cutanées pendant 7 jours (soit 15,30 ou 50µg/kg par jour) Sousa et al, 1999 – 5 ou 10 mg/kg i.p. pendant 7 jours
		+30 jours	Zeigler et al, 1991 – 20 mg/kg s.c.par jour pendant 5j

- Modification des D2-like dans la voie mésocorticolimbique :

Les récepteurs D2-like, comprenant les D2, D3 et D4 peuvent être localisés au niveau postsynaptique mais aussi au niveau présynaptique ou ils jouent un rôle d'autorécepteurs inhibiteurs (voir Chapitre I.).

La voie mésocorticolimbique présente de fortes variations des D2-like suite à des traitements répétés à la cocaïne (Tableau 7). En effet, bien qu'aucune variation n'ait été mise en évidence dans l'aire tegmentale ventrale suite à des traitements de 2, 7 et 14 jours (Unterwald et al, 1994), de nombreuses variations ont été observées au niveau des terminaisons dopaminergiques dans le noyau accumbens et le cortex préfrontal.

Dans le noyau accumbens, Unterwald et collaborateurs ont mis en évidence une augmentation de la densité des D2-like dans la partie rostrale de cette structure, 30 minutes après la fin d'un traitement fort (3 injections par jour de 15mg/kg) et d'une durée de 7 jours. Ils observent aussi que cela est transitoire au cours du traitement car il n'y a pas de modification si le traitement est plus court (2

jours) ou plus long (14 jours) (Unterwald et al, 1994). Cependant, alors que Unterwald et collaborateurs, ne voient plus de modification de ces récepteurs après 14 jours de traitement, Kleven et collaborateurs (1990) montrent une augmentation des D2-like dans le noyau accumbens après 15 jours de traitement pour deux doses quotidiennes de cocaïne différentes (10 et 20mg/kg, Kleven et al, 1990). La densité des D2-like est donc augmentée au cours des traitements et immédiatement après la fin (Peris et al, 1990 ; Kleven et al, 1990 ; Unterwald et al, 1994) mais cela ne persiste pas après un sevrage prolongé de 7 jours (Peris et al, 1990), 14 jours (Kleven et al, 1990) ou 30 jours (Zeigler et al, 1991). Ces différentes études nous montrent que le mode d'administration de la cocaïne est également très important car les traitements par injection en sous cutanée continue n'ont pas montré de variation des D2-like (Kunko et al, 1998 ; Stanwood et al, 2000) contrairement aux traitements en i.p. cités ci-dessus.

Dans le cortex préfrontal, Kleven et collaborateurs ont montré une diminution de la densité des D2-like immédiatement après la fin d'un traitement à la cocaïne de 15 jours avec des doses journalières de 10 et 20 mg/kg, administrées par voie intrapéritonéale (Kleven et al, 1990). Ceci ne persiste cependant pas après 14 jours de sevrage. Zeigler et collaborateurs, ont quant à eux rapporté une augmentation des D2-like dans le cortex préfrontal après 30 jours de sevrage suite à un traitement de 5 jours avec 20 mg/kg par jour administrée en sous cutanée. Ils montrent également que le mode d'administration a une influence sur la variation des récepteurs car cette augmentation n'a pas été observée pour le même traitement mais avec une délivrance de la cocaïne en diffusion continue pendant les 5 jours de traitement (Zeigler et al, 1991).

Tableau 7. Variation de la densité des récepteurs dopaminergiques D2-like dans la voie mésocorticolimbique

D2-like	Variation observée	Temps après la dernière injection	Publication - Traitement effectué
ATV	=	+ 30min	<i>Untrewald et al, 1994</i> – 15 mg/kg i.p. 3 fois par jour pendant 2,7 ou 14 jours.
Nac	↑	+20 min	<i>Kleven et al, 1990</i> – 10 ou 20 mg/kg i.p. par jour pendant 15j
		+30 min	<i>Untrewald et al, 1994</i> – 15 mg/kg i.p. 3 fois par jour pendant 7 jours.
		+1 jour	<i>Peris et al, 1990</i> – 10 mg/kg i.p. par jour pendant 8 jours
	=	+30 min	<i>Untrewald et al, 1994</i> – 15 mg/kg i.p. 3 fois par jour pendant 2 ou 14 jours.
		+1 jour	<i>Kunko et al, 1998</i> – 1µl/heure en continu (minipompes sous cutanées) pendant 7 jours (soit 15,30 ou 50µg/kg par jour) <i>Stanwood et al, 2000</i> – 20mg/kg par jour en continu (minipompes sous cutanées) pendant 14 jours
		+7 jours	<i>Peris et al, 1990</i> – 10 mg/kg i.p. par jour pendant 8 jours
		+14 jours	<i>Kleven et al, 1990</i> – 10 ou 20 mg/kg i.p. par jour pendant 15j
CPF	↓	+ 20 min	<i>Kleven et al, 1990</i> – 10 ou 20 mg/kg par jour pendant 15j
		+ 30 jours	<i>Zeigler et al, 1991</i> – 20 mg/kg par jour pendant 5j
	=	+ 14 jours	<i>Kleven et al, 1990</i> – 10 ou 20 mg/kg par jour pendant 15j
		+ 30 jours	<i>Zeigler et al, 1991</i> – environ 20mg/kg par jour en diffusion continue ou en injection s.c. pendant 5 jours

- Modification des D2-like dans la voie nigrostriée :

En ce qui concerne la voie nigrostriée, les récepteurs D2-like sont augmentés au niveau des corps cellulaires dopaminergiques dans la substance noire, après un sevrage de 30 jours suite à des traitements en sous cutanée pendant 5 jours (Zeigler et al, 1991) (Tableau 8). Ceci n'est pas observé après des temps de sevrage très courts suite à un traitement par voie intrapéritonéale de 2, 7 ou 14 jours (Unterwald et al, 1994) ou par voie sous-cutanée de 14 jours (Stanwood et al, 2000).

Dans le striatum, structure des terminaisons dopaminergiques de la voie nigrostriée, de nombreuses variations ont été rapportées pour les récepteurs D2-like. Quelques études ont mis en évidence une augmentation de la densité des D2-like après des traitements répétés à la cocaïne, ne dépassant pas 5 à 7 jours de traitement, pour des doses variant de 5 à 45 mg/kg par jour et administrées en une ou trois fois (Zeigler et al, 1991 ; Unterwald et al, 1994 ; Sousa et al, 1999). Pour des traitements d'une durée plus longue (7 à 15 jours), l'observation des récepteurs après la fin des traitements montre le résultat inverse puisque les récepteurs D2-like sont plutôt diminués dans le striatum (Kleven et al, 1990 ; Tsukada et al, 1996). Toutefois ce résultat n'a pas été observé dans toutes les études utilisant un traitement de 14 jours (Unterwald et al, 1994).

Ces variations suite à des traitements répétés à la cocaïne ne semblent pas persister après des périodes de sevrage prolongées de 14 jours (Kleven et al, 1990) ou 30 jours (Zeigler et al, 1991) et ne sont pas observées après des traitements en perfusion continue par des mini-pompes sous cutanées (Kunko et al, 1998).

Tableau 8. Variation de la densité des récepteurs dopaminergiques D2-like dans la voie nigrostriée

D2-like	Variation observée	Temps après la dernière injection	Publication - Traitement effectué
SN	↑	+30 jours	Zeigler et al, 1991 – environ 20mg/kg par jour en diffusion continue ou en injection s.c. pendant 5 jours
	=	+30 min	Untrewald et al, 1994 – 15 mg/kg i.p. 3 fois par jour pendant 2, 7 ou 14 jours.
		+1 jour	Stanwood et al, 2000 – 20mg/kg par jour en continu (minipompes sous cutanées) pendant 14 jours
Striatum dorsal	↓	+ 20 min	Kleven et al, 1990 – 10 ou 20 mg/kg i.p. par jour pendant 15j
		+ 1 heure + 3.5 heures	Tsukada et al, 1996 – 15mg/kg i.p., 3 fois par jours pendant 7 ou 14 jours.
	↑	+ 30 jours	Zeigler et al, 1991 – 20 mg/kg s.c.par jour pendant 5j
		+ 30 min	Untrewald et al, 1994 – 15 mg/kg i.p. 3 fois par jour pendant 7 jours.
		+1 jour	Sousa et al, 1999 – 5 ou 10mg/kg i.p. pendant 7 jours
	=	+ 30 min	Untrewald et al, 1994 – 15 mg/kg i.p. 3 fois par jour pendant 14 jours.
		+1 jour	Kunko et al, 1998 – diffusion continue (minipompes sous cutanées) pendant 7 jours (soit 15,30 ou 50µg/kg par jour)
		+14 jours	Kleven et al, 1990 – 10 ou 20 mg/kg i.p. par jour pendant 15j
		+30 jours	Zeigler et al, 1991 – environ 20mg/kg par jour en diffusion continue s.c. pendant 5 jours.

- Conclusion et interprétation :

L'ensemble des études réalisées jusqu'à maintenant, révèlent que les modifications induites sont complexes et qu'il est très difficile d'établir un consensus en se basant sur les variations de la densité des récepteurs.

Anderson et Pierce (2005) tentent d'expliquer les différences observées par les différents délais d'observation effectués dans chaque étude après la dernière injection de cocaïne. Ils tentent de distinguer les mécanismes d'initiation et de mise en place de la dépendance et les mécanismes d'expression de la dépendance. Malgré cela, les résultats ne peuvent bien souvent pas s'expliquer de cette façon. En effet, la variation observée n'est pas forcément la même pour un même délai d'observation et pour une même structure. Par exemple, Kleven et collaborateurs en 1990, ont observé une diminution des D1-like dans le noyau accumbens, 20 minutes après la dernière injection de leur traitement, alors que Unterwald et collaborateurs ont observé une augmentation des D1-like dans cette même structure, 30 minutes après la fin de leur traitement. Pour les D2-like des contradictions dans les résultats sont également observables, comme par exemple une augmentation mise en évidence par Sousa et collaborateurs en 1999 dans le noyau accumbens après un jour de sevrage alors que Kunko et collaborateurs (1998) n'observent pas de changement de ces récepteurs dans cette même structure un jour après la fin de leur traitement.

Cette grande diversité de résultats s'accompagne d'une grande diversité de protocoles d'administration de la cocaïne, qui diffèrent par la voie d'administration, la fréquence d'administration, la quantité de cocaïne et la durée des traitements. Les différences pourraient être responsables des disparités dans les résultats énoncés précédemment et devraient être pris en compte pour l'interprétation des variations rapportées.

2. Modifications du signal de transduction et réactivité neuronale.

En plus des modifications dans la densité des récepteurs dopaminergiques, la prise répétée de cocaïne perturbe le signal de transduction de ces récepteurs. Une diminution des protéines G inhibitrices Gi/Go dans le noyau accumbens et l'aire tegmentale ventrale (Nestler et al, 1990 ; Kalivas et al, 1992 ; Striplin et Kalivas, 1992) et une augmentation des molécules de signal c-AMP et de l'activité de l'adénylate cyclase dans le noyau accumbens et dans le striatum ont été mis en évidence (Terwilliger et al, 1991 ; Unterwald et al, 1996). Ces modifications des protéines du signal de transduction des récepteurs dopaminergiques induisent une hyposensibilité des récepteurs D2-like inhibiteurs et une hypersensibilité des récepteurs D1-like activateurs (Nestler et al, 1990 ; Henry et White, 1991). Une corrélation inverse a été mise en évidence entre l'activité locomotrice et la quantité de protéines G dans l'aire tegmentale ventrale, ce qui montre que l'activité de transduction des récepteurs est directement liée au comportement (Striplin et Kalivas, 1992). Au niveau fonctionnel, ces altérations se traduisent par une diminution de la régulation de l'activité des neurones de l'aire tegmentale ventrale par les autorécepteurs inhibiteurs D2 présynaptiques, ce qui entraîne une augmentation de la réactivité neuronale de la voie dopaminergique mésolimbique. Au

niveau postsynaptique, l'hypersensibilisation des récepteurs D1-like dans le noyau accumbens, entraîne une augmentation de la réactivité des neurones du noyau accumbens face à l'effet modulateur de la dopamine (Henry et White, 1991 ; Henry et White, 1995 ; Li et al, 2000).

L'augmentation de l'activité basale des neurones dopaminergiques via une hyposensibilité des récepteurs D2 présynaptiques serait transitoire et interviendrait dans la mise en place et l'initiation de l'addiction (Kalivas et al, 1992), l'augmentation de l'adénylate cyclase corrélée à l'hyposensibilité des récepteurs D2-like n'est en effet plus observée dans le noyau accumbens, après 7 jours de sevrage d'un traitement répété (Mayfield et al, 1992). En revanche, l'augmentation de la sensibilité des neurones du noyau accumbens via l'hypersensibilité des récepteurs D1 postsynaptique serait plus persistante et interviendrait dans l'expression de l'addiction (Henry et al, 1998).

iii. Les modifications du système dopaminergique et les comportements de l'addiction.

- La sensibilisation comportementale :

Parallèlement à l'augmentation de l'activité comportementale, il a été démontré que les catécholamines seraient augmentées au fur et à mesure des injections de cocaïne (Maisonneuve et al, 1994, 1995 ; Tassin et al, 2006).

Les récepteurs dopaminergiques sont très fortement impliqués dans les processus d'initiation de la sensibilisation (McCreary et Marsden, 1993). Il a été montré qu'un traitement avec un agoniste des D2-like et un agoniste des D1-like entraîne une sensibilisation comportementale croisée avec la cocaïne. De plus, ces traitements avec des agonistes dopaminergiques suffisent à reproduire la diminution de la sensibilité des autorécepteurs inhibiteurs D2 de l'aire tegmentale ventrale et de la sensibilisation des récepteurs D1-like dans le noyau accumbens, observées après des traitements répétés à la cocaïne (Henry et al, 1998). L'hyposensibilité des D2 est souvent associée à la phase d'initiation de la sensibilisation, tandis que l'hypersensibilité des D1 est associée à l'expression de la sensibilisation (Henry et White, 1995, Henry et al, 1998).

Toutefois, les D1-like sont aussi impliqués dans les phases d'initiation de la sensibilisation. En effet, la co-administration hebdomadaire d'un antagoniste D1-like avec de la cocaïne lors d'un traitement de 4 semaines, bloque la mise en place de la sensibilisation (McCreary et Marsden, 1993). Ces antagonistes D1 bloquent la sensibilisation que s'ils sont injectés au début du traitement sensibilisant, et ne sont plus efficaces par la suite (Choi et al, 2005). Au contraire, les récepteurs D2-like réguleraient négativement la mise en place de la sensibilisation car la co-administration

hebdomadaire d'un antagoniste D2-like avec de la cocaïne potentialise la mise en place de la sensibilisation (McCreary et Marsden, 1993).

- Association des effets renforçants de la cocaïne à des indices environnementaux :

La dopamine est impliquée dans l'association conditionnée entre l'effet renforçant de la cocaïne et l'environnement dans lequel elle est administrée. Ceci peut être mesuré grâce à un paradigme expérimental appelé préférence de place conditionnée (PPC). La PPC est un test comportemental qui permet de mettre en évidence l'effet appétant ou aversif d'une substance, par association de ses effets renforçants avec un contexte spécifique.

Les récepteurs dopaminergiques jouent un rôle dans l'association conditionnée entre le renforcement et le contexte. Les D1-like favorisent la PPC car l'injection d'un antagoniste D1-like bloque la PPC tandis qu'un agoniste la renforce. Cependant, le rôle des D2-like est plus complexe et nécessite d'être élucidé. En effet, il est établi qu'un antagoniste des récepteurs D2-like n'a pas d'effet sur la PPC mais l'administration d'agonistes D3 (qui font partie de la famille des D2-like) prévient la mise en place de la PPC, et un agoniste des D2-like avec une affinité supérieure pour les D3 entraîne à lui seul une PPC (Anderson et Pierce, 2005).

Il a été mis en évidence que l'exposition d'animaux à un contexte associé à la cocaïne, entraînait une augmentation locomotrice sans réinjection de cocaïne (Duvauchelle et al, 2000).

- Recherche de drogue, « craving », rechute :

L'addiction se caractérise aussi par l'envie irrépressible de consommer de la drogue conduisant à la rechute de la consommation. La rechute après un sevrage peut être induite par trois types de stimuli : un stress, un indice environnemental associé à la prise de drogue ou la réexposition à la drogue elle-même.

Les récepteurs dopaminergiques interviennent dans les processus de rechute, notamment les récepteurs D2-like, qui jouent un rôle dans l'initiation de la rechute. L'administration d'agonistes D2 induit une augmentation du comportement de recherche de drogue chez des animaux abstinents pour la cocaïne (Spealman et al, 1999, Self et al, 1996), alors que la co-administration d'un antagoniste D2-like avec une injection de cocaïne chez des rats abstinents, atténue le comportement de recherche qu'aurait provoqué la réexposition à la drogue (Self et al, 1996).

Au contraire un agoniste des D1-like n'entraîne pas de comportement de recherche de drogue (Self et al, 1996) mais atténue la rechute induite par une injection de cocaïne chez des rats ayant subi un sevrage (Spealman et al, 1999). Ces résultats montrent que les deux types de récepteurs jouent un rôle opposé dans les processus de rechute.

c. Les effets d'une prise répétée de cocaïne sur le système glutamatergique.

Les modifications de la neurotransmission dopaminergique induites par la prise de cocaïne, sont souvent présentées comme les principales médiatrices des mécanismes addictifs. Cependant, la dopamine est en interaction étroite avec de nombreux autres systèmes de neurotransmetteurs et la prise de cocaïne induit également des modifications importantes sur ces systèmes. Le système glutamatergique est un des principaux constituants du système mésocorticolimbique et les modifications de sa neurotransmission, contribuent avec la dopamine à la mise en place et au maintien robuste de la dépendance.

i. Modifications du glutamate extracellulaire.

Le glutamate basal extracellulaire provient majoritairement (60%) de l'activité de l'échangeur cystine-glutamate exprimé à la membrane des cellules gliales périssynaptiques. Le taux de glutamate extracellulaire est normalement maintenu à un taux physiologique grâce aux transporteurs GLUT1 aussi exprimés sur les cellules gliales (voir figure 11).

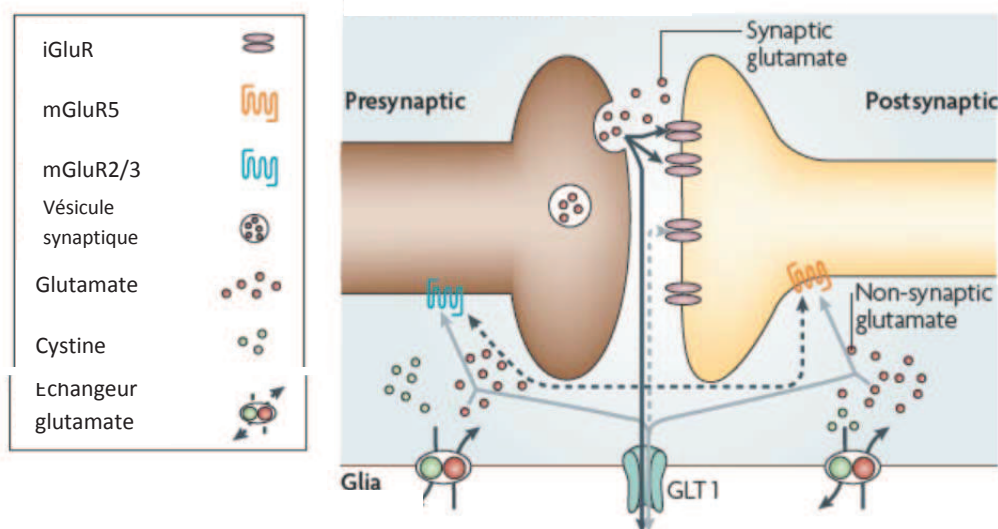


Figure 11. Régulation du taux de glutamate extracellulaire au niveau synaptique.

En temps normal les taux de glutamate sont régulés par différents éléments synaptiques et extra synaptiques afin de maintenir un niveau physiologique de stimulation des récepteurs ionotropiques (iGluR) post synaptiques. GLUT1 est un transporteur qui recapture le glutamate, il est situé sur les cellules gliales périssynaptiques. Les récepteurs métabotropiques (mGluR) extrasynaptiques régulent la libération vésiculaire glutamatergique lorsqu'ils détectent une trop grande quantité de glutamate extracellulaire. L'échangeur cystine-glutamate sur la membrane des cellules gliales, maintient des taux de base extracellulaires suffisants, en échangeant de la cystine avec du glutamate intracellulaire (Kalivas et al, 2009).

Les taux basaux de glutamate extracellulaire sont dérégulés suite à une prise répétée de cocaïne (Tableaux 9 et 10.). En effet, plusieurs études décrivent une diminution des taux extracellulaires de glutamate dans le noyau accumbens (Pierce et al, 1996, Bell et al, 2000, Hostenpiller et al, 2001, McFarland et al, 2003, Baker et al, 2003, tableau 9) mais pas dans l'aire tegmentale ventrale, le cortex préfrontal ou le Striatum (Kalivas et Duffy, 1998, Baker et al, 2003, Xie et Steketee, 2008, tableau 10). Les traitements qui ont mis en évidence une diminution des taux de glutamate utilisent des doses allant de 15 à 30 mg/kg par jour, injectées en i.p. pendant 6 à 7 jours. Cette perturbation est mise en place dès le premier jour de sevrage (McFarland et al, 2003), et persiste jusqu'à 3 semaines de sevrage (Pierce et al, 1996, Bell et al, 2000, Baker et al, 2003).

La diminution des taux de glutamate dans le noyau accumbens et plus particulièrement dans le core est attribuée à une baisse d'activité de l'échangeur cystine-glutamate (Kalivas, 2009). Il a d'ailleurs été démontré que le rétablissement de l'activité de cet échangeur par de la N-acétyl cystéine, permet de prévenir le comportement de recherche provoqué par une injection aiguë de cocaïne chez des rats ayant appris à s'autoadministrer de la cocaïne et qui auraient subi une extinction (Baker et al, 2003). L'activité de l'échangeur cystine/glutamate s'inscrit dans un système de régulation synaptique homéostatique, impliquant également les transporteurs gliaux GLT1 et les récepteurs métabotropiques glutamatergiques extrasynaptiques (figure 11.). C'est donc un système complexe qui est perturbé lors de la diminution des taux extracellulaire de glutamate (Kalivas, 2009).

Malgré ces résultats concordants, une étude n'a pas mis en évidence de modifications des taux de base extracellulaires de glutamate dans le noyau accumbens (Xie et Steketee, 2008). Cette dernière utilise un protocole d'administration forcée, sans conditionnement particulier entre les effets renforçants de la cocaïne et des indices, contrairement aux protocoles d'auto administration (Miguens et al, 1996) ou aux protocoles de conditionnement pavlovien (Bell et al, 2000 ; Hostenpiller et al, 2001) utilisés dans les autres études. Il a donc été avancé que l'administration répétée de cocaïne avait des conséquences sur les taux de base de glutamate uniquement si un paramètre de conditionnement était introduit dans le traitement (Bell et al, 2000 ; Hostenpiller et al, 2001) (voir partie « impact des modifications glutamatergiques sur le comportement »).

Tableau 9. Etudes rapportant une diminution des taux de base de glutamate extracellulaire

Diminution	Profil d'administration utilisé	Structure	Moment d'observation
<i>Pierce et al, 1996</i>	J 1 : 15mg/kg puis J 2-6 : 30 mg/kg et J 7 : 15mg/kg i.p.	Nac core (pas shell)	+ 3 semaines
<i>Bell et al, 2000</i>	15 mg/kg i.p. par jour pendant 7 jours avec conditionnement à un contexte	Nac	+ 3 semaines
<i>Hostenpiller et al, 2001</i>	15 mg/kg i.p. associé à des stimuli pendant 6 jours	Nac limite core/shell	+ 2, + 4 et + 6 jours
<i>McFarland et al, 2003</i>	Administration de doses équivalentes à des rats en autoadministration (environ 20.5mg/kg par jour en i.v.)	Nac core	+ 24 heures
<i>Baker et al, 2003</i>	15-30 mg/kg par jour pendant 7 jours	Nac	+ 3 semaines

(Nac : noyau accumbens)

Tableau 10. Etudes ne rapportant pas de modification des taux de base de glutamate extracellulaire.

Pas de modification	Profil d'administration utilisé	Structure	Moment d'observation
<i>Kalivas et Duffy 1998</i>	J 1 : 15mg/kg puis J 2-6 : 30 mg/kg et J 7 : 15mg/kg i.p.	ATV	+ 3 semaines
<i>Baker et al, 2003</i>	15-30 mg/kg par jour pendant 7 jours	CPF et Striatum	+ 3 semaines
<i>Xie et Steketee, 2008</i>	15mg/kg i.p. pendant 4 jours	Nac core et ATV	+ 1, +7 et + 30 jours

(ATV : aire tegmentale ventral, CPF : cortex préfrontal, Nac : noyau accumbens)

ii. Les modifications du système glutamatergique et les comportements de l'addiction

- La sensibilisation comportementale :

Un traitement répété à la cocaïne conduit à une augmentation répétée de la libération de glutamate vésiculaire présynaptique, par stimulation de l'activité neuronale et non vésiculaire gliale, via l'échangeur cystine-glutamate glial (Xue et Steketee, 2008). Cette augmentation répétée et non

physiologique, apparentée à la sensibilisation, a des conséquences sur la réactivité neuronale et la régulation de la neurotransmission de l'ensemble du système glutamatergique dans le système mésocorticolimbique.

Les récepteurs NMDA et AMPA, participent à l'initiation de la sensibilisation et aux modifications de l'activité neuronale associées. Une augmentation transitoire de la réactivité des récepteurs AMPA dans l'aire tegmentale ventrale est observée pendant la phase d'initiation de la sensibilisation ainsi qu'une diminution de leur sensibilité dans le noyau accumbens (White et al, 1995). Ceci est en accord avec les modifications de la réactivité neuronale provoquées par les perturbations des récepteurs dopaminergiques au cours de l'initiation de la sensibilisation (augmentation de la réactivité des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale par une hyposensibilité des D2-like et augmentation de la sensibilité des neurones du noyau accumbens par une hypersensibilisation des D1-like) (Nestler et al, 1990 ; Henry et White, 1991, 1995 ; Henry et al, 1998 ; Li et al, 2000).

L'injection d'antagonistes NMDA ou AMPA lors de traitements sensibilisants atténuent les modifications neuronales et l'expression comportementale de la sensibilisation (Wolf, 1998).

- Association des effets renforçants de la cocaïne à des indices environnementaux

Suite à une prise répétée de cocaïne les perturbations de la neurotransmission participent à la mise en place de la composante mnésique de l'addiction qui se caractérise par une sensibilité accrue aux indices environnementaux associés au renforcement intense de la cocaïne. Cet encodage robuste impliquant majoritairement le glutamate et son interaction avec la dopamine, rend l'individu dépendant, très vulnérable à l'émergence de « craving » et aux risques de rechute (Kelley et al, 2004 ; Robbins et al, 2008) par la présentation d'indices de rappel.

Lors de l'administration répétée de cocaïne, l'ajout d'un conditionnement environnemental au cours de traitements à la cocaïne peut rendre plus robuste la trace mnésique du renforcement positif de la cocaïne. En effet, l'administration de cocaïne dans un environnement conditionnant, conduit à une sensibilisation comportementale plus robuste que si la drogue est administrée dans les cages d'habitation (Weiss et al, 1989). De plus, les taux de glutamate extracellulaire sont modifiés de façon plus importante (Bell et al, 2000 ; Hotsenpiller et al, 2001) et les modifications de la plasticité synaptique induites par un traitement à la cocaïne peuvent persister plusieurs mois au lieu de quelques jours (Bowers, 2010). Les récepteurs glutamatergiques, sont également plus fortement impliqués dans la mise en place et l'expression de la sensibilisation, lorsque le renforcement de la cocaïne est associé à un stimulus environnemental (Wolf, 1998).

Les modifications des taux de base de glutamate qui ont lieu dans le noyau accumbens, sont plus importantes dans le core, qui est impliqué dans les processus d'associations conditionnées (Pierce et al, 1996 ; Miguens et al, 2008a ; McFarland et al, 2003).

Le glutamate joue donc un rôle dans l'association conditionnée du renforcement à la cocaïne avec des indices environnementaux ce qui favorise les processus de rechute et de « craving » (Cornish et al, 1999, 2000).

L'introduction d'un conditionnement entre l'effet renforçant de la cocaïne et des stimuli environnementaux entrainerait le recrutement de voies supplémentaires par rapport à des traitements non conditionnants. Ces voies pourraient être les afférences glutamatergiques en provenance de l'amygdale vers le noyau accumbens, connues pour être impliquées dans les processus d'association entre stimulus et renforcement (Wolf, 1998 ; Everitt et al, 1991).

- Recherche de drogue, « craving », rechute.

De nombreuses études indiquent un rôle primordial du circuit glutamatergique mésocorticolimbique dans les processus de recherche de drogue et de rechute, en interaction avec le système dopaminergique (Cornish et al, 1999, 2000 ; Cornish et Kalivas, 2001). Le glutamate est impliqué dans la sensibilité accrue aux indices environnementaux associés à la prise de drogue, qui provoquent un rétablissement du comportement de recherche et du « craving » même après un sevrage prolongé (Bell et al, 2000 ; Hotsenpiller et al, 2001). D'après Kalivas (2009), cette hypersensibilité aux indices environnementaux est associée à la diminution du taux de base de glutamate extracellulaire dans le noyau accumbens, puisqu'un rétablissement de ces taux de base permet d'atténuer le comportement de recherche de drogue provoqué par l'exposition à un indice de rappel (Baker et al, 2003). La rechute est étroitement liée aux modifications de la neurotransmission glutamatergique car elle est accompagnée d'une forte augmentation de glutamate dans le core du noyau accumbens (Hotsenpiller et al, 2001). De plus, l'injection d'agonistes AMPA ou NMDA dans cette même région, entraîne une rechute chez des rats abstinents (Cornish et al, 1999) alors que des antagonistes l'abolissent (Cornish et al, 2000).

Le core du noyau accumbens semble être la structure des perturbations glutamatergiques et l'inactivation de l'aire prélimbique du cortex préfrontal médian, qui émet des afférences vers le noyau accumbens core abolit le comportement de recherche ainsi que l'augmentation de glutamate suite à la présentation d'un indice de rappel. Cela met en évidence que les afférences prélimbiques sont la source principale d'augmentation du glutamate (McFarland et al, 2003 ; Kalivas, 2009) qui conduit à la recherche de drogue et au « craving » précédant la rechute.

d. Interactions entre le système dopaminergique et le système glutamatergique dans les processus de l'addiction.

Les systèmes glutamatergiques et dopaminergiques sont en interaction et exercent une influence l'un sur l'autre via des régulations cellulaires et moléculaires.

Le glutamate est régulé par la dopamine via différents mécanismes. D'une part, les récepteurs D2 situés sur les éléments présynaptiques dans le noyau accumbens, régulent la libération de glutamate en provenance du cortex préfrontal médian (Sesack et Grace, 2010). De plus, l'augmentation de glutamate dans l'aire tegmentale ventrale dépend de l'activité des récepteurs D1-like (Kalivas et Duffy, 1995) et la libération de glutamate en réponse à une dose de rappel de cocaïne chez des animaux sensibilisés, peut être atténuée par une perfusion de l'antagoniste D1-like, SCH 23390 dans l'aire tegmentale ventrale, ce qui diminue l'effet renforçant de la cocaïne (Kalivas et Duffy ; 1998, Cornish et al, 1999).

La libération de dopamine est elle aussi dépendante de l'activité des récepteurs glutamatergiques puisque la perfusion d'AMPA dans le noyau accumbens core chez des rats sensibilisés induit une augmentation dose dépendante de la libération de dopamine (Pierce et al, 1996). De plus, une rechute induite par l'injection de dopamine dans le noyau accumbens peut être totalement bloquée grâce à une perfusion d'antagonistes AMPA (Cornish et al, 2000). En revanche, le blocage des D1-like n'atténue pas la rechute si elle est provoquée par une injection d'AMPA dans le noyau accumbens core. Enfin, une injection de glutamate dans l'aire tegmentale ventrale après 3 jours de sevrage, entraîne une augmentation de la libération de dopamine dans le noyau accumbens et dans l'aire tegmentale ventrale chez des animaux traités avec de l'amphétamine pendant 5 jours (Giorgetti et al, 2001).

Ces deux systèmes participent aux modifications de la plasticité et de la réactivité neuronale provoquées par la cocaïne. L'hypersensibilisation des D1-like observée suite à un traitement sensibilisant à la cocaïne, altère la transmission glutamatergique dans le noyau accumbens core car cela favorise la LTD des MSNs par une interaction moléculaire intracellulaire entre les récepteurs D1 et des récepteurs AMPA (Henry et White, 1991, Nestler et al, 1990, Beurrier et Malenka, 2002, Thomas et al, 2001).

De plus, le passage d'une activité phasique à une activité tonique des neurones dopaminergiques en présence d'un indice de rappel, pourrait être régulé par le glutamate (Bowers et al, 2010). En effet, selon le niveau de base extracellulaire de glutamate dans le core du noyau accumbens, la sensibilité aux indices environnementaux associés à la prise de la cocaïne est différente (Baker et al, 2003).

Plusieurs données suggèrent que la neurotransmission glutamatergique dans le noyau accumbens soit principalement responsable des processus de recherche de drogue et de rechute, tandis que ce

serait une interaction entre la dopamine et le glutamate qui serait responsable du maintien du comportement de consommation (Cornish et Kalivas, 2001).

3. Réponses comportementales et neurobiologiques à une dose de rappel de cocaïne.

La consommation répétée de cocaïne entraîne de fortes perturbations neurobiologiques au niveau neurochimique, cellulaire et moléculaire dans le système mésocorticolimbique. Ces perturbations persistent après la fin de traitements répétés. L'administration d'une dose de rappel de cocaïne suite à un sevrage, a des conséquences différentes chez des animaux ayant préalablement été traités par rapport à des rats naïfs.

a. Réponses comportementales à une dose de rappel de cocaïne.

L'injection d'une dose de rappel de cocaïne après un sevrage, entraîne souvent une augmentation exacerbée de la réponse locomotrice chez des rats prétraités à la cocaïne par rapport à des animaux naïfs (Reith et al, 1987 ; Kalivas et al, 1988 ; Peris et al, 1990 ; Robertson et al, 1990 ; Kalivas et al, 1992 ; Segal et Kuczenski ; 1992, King et al, 1992 ; Kalivas et Duffy, 1993 a et b et 1998 ; Henry et White, 1995 ; Heidbreder et al, 1996 ; Cadoni et al, 1999 ; Li et al, 2000) (Tableau 11). Cette sensibilisation locomotrice en réponse à l'injection d'une dose de rappel de cocaïne a pu être observée avec des profils d'administration très différents. Des traitements mettant en jeu des doses allant de 7,5 mg/kg (Kalivas et al, 1988) à 40 mg/kg (King et al, 1992) par jour, injectées en intrapéritonéale (Kalivas et al, 1988 ; Peris et al, 1990 ; Robertson et al, 1990 ; Kalivas et al, 1992 ; Segal et Kuczenski, 1992 ; Kalivas et Duffy ; 1993 a et b et 1998 ; Henry et White, 1995 ; Heidbreder et al, 1996 ; Cadoni et al, 1999 ; Li et al, 2000) ou en sous cutanée (Reith et al, 1987 ; King et al, 1992) en une injection (Reith et al, 1987 ; Kalivas et al, 1988 ; Peris et al, 1990 ; Robertson et al, 1990 ; Kalivas et al, 1992 ; Segal et Kuczenski, 1992 ; King et al, 1992 ; Kalivas et Duffy 1993 a et b et 1998 ; Heidbreder et al, 1996 ; Li et al, 2000) ou plusieurs injections (Unterwald et al, 1994 ; Henry et White, 1995 ; Cadoni et al, 1999) quotidiennes ou hebdomadaires (McCreary et Marsden, 1993) ont conduit à une sensibilisation locomotrice. Cela persiste à long terme même après des périodes de sevrage prolongées de plusieurs semaines (Heidbreder et al, 1996, Kalivas et Duffy, 1998) à un mois (Henry et White 1995).

Quelques études n'ont pas pu mettre en évidence de sensibilisation après des traitements intermittents à la cocaïne (Kalivas et al, 1988, Robertson et al, 1990). Ces dernières impliquaient une forte dose quotidienne de cocaïne, injectée en intrapéritonéale (30mg/kg), or il a été mis en évidence

que ce type de traitement pouvait conduire à une atténuation de la réponse neurochimique en réponse à la dose de rappel de cocaïne, ce qui pourrait expliquer l'atténuation de la réponse comportementale (Kalivas et Duffy, 1993a).

La sensibilisation est caractéristique d'une administration répétée de cocaïne car une administration de cocaïne par diffusion lente et continue entraîne plutôt une tolérance locomotrice, c'est-à-dire une réponse locomotrice inférieure pour les animaux prétraités par rapport aux animaux naïfs (King et al, 1992 ; Reith et al, 1987 ; Kunko et al, 1998) (Tableau 11).

En plus d'induire une augmentation de la réponse locomotrice suite à l'injection d'une dose de rappel de cocaïne, l'administration répétée de cocaïne peut également induire l'expression de stéréotypies (Kalivas et al, 1988 ; Peris et al, 1990 ; Segal et Kuczenski, 1992 ; King et al, 1992 ; Henry et White, 1995 ; Heidbreder et al, 1996 ; Kalivas et Duffy, 1998 ; Cadoni et al, 1999 ; Li et al, 2000). Ces comportements caractéristiques des psychostimulants, ne sont visibles que lorsque les animaux sont sous l'effet de la cocaïne lors de l'injection de la dose de rappel (Kelly et al, 1975). Ils semblent être l'expression de perturbations centrales complexes mettant en jeu de nombreux neurotransmetteurs, dont le système dopaminergique (Karler et al, 1998), glutamatergique (Karler et al, 1994), sérotoninergique (Herges et Taylor, 1998, 1999, 2000) et cholinergique (Aliane et al, 2011). Toutefois, si la voie mésolimbique semble être responsable des réponses locomotrices de la sensibilisation c'est au niveau striatal (donc au niveau de la voie nigro-striée) qu'ont lieu les régulations des comportements stéréotypés (Kelly et al, 1975 ; Sharp et al, 1987 ; Wolf, 1998 ; Aliane et al, 2011).

Tableau 11. Réponses comportementales à une dose de rappel suite à un traitement répété à la cocaïne.

Réponse à un rappel	Traitement	Dose de rappel Temps de sevrage	Réponse comportementale
<i>Reith et al, 1987</i> (Souris)	20,4 mg/kg/jour i.p. ou s.c. pendant 18 jours	25mg/kg +7 jours	Sensibilisation (locomotion)
	25 mg/kg/jour en perfusion continue s.c. pendant 18 jours	25mg/kg +7 jours	Tolérance (locomotion)
<i>Kalivas et al, 1988</i> (Rats)	7,5 ou 15 mg/kg par jour i.p. pendant 3 jours	15 mg/kg +48h +14 jours	Sensibilisation (locomotion et stéréotypies)
	30mg/kg par jour i.p. pendant 3 jours	15 mg/kg +48h +14 jours	Pas de différence avec les prétraités saline
<i>Peris et al, 1990</i> (Rats)	10mg/kg/jour i.p. pendant 8 jours	10mg/kg +7 jours	Sensibilisation (locomotion et stéréotypies)
<i>Robertson et al, 1990</i> (Rats)	30mg/kg/ jour i.p. pendant 18 jours	30mg/kg +7 jours	Pas de différence avec les prétraités saline
<i>Kalivas et al, 1992</i> (Rats)	15mg/kg à j1 puis 30mg/kg de j2 à j6 i.p.	15 mg/kg +24 heures +2 semaines	Sensibilisation (locomotion)
<i>Segal et Kuczenski, 1992</i> (Rats)	10mg/kg/jour pendant 4 jours	10mg/kg +48 heures	Sensibilisation (locomotion horizontale et stéréotypies)
<i>King et al, 1992</i> (Rats)	40mg/kg/jour s.c. pendant 14 jours	20mg/kg +1 jour +7 jours	Sensibilisation (locomotion horizontale et stéréotypies)
	40mg/kg/jour en perfusion continue s.c. pendant 14 jours	20mg/kg +1 jour +7 jours	Tolérance (locomotion)
<i>Kalivas et Duffy, 1993a et 1993b</i> (Rats)	15mg/kg à j1 puis 30mg/kg de j2 à j6 i.p.	15 mg/kg +24h +11-15 jours	Sensibilisation (locomotion)
<i>Henry et White, 1995</i> (Rats)	10mg/kg 2 fois par jour pendant 14 jours	10mg/kg +1 jour +1 semaine +1 mois	Sensibilisation (locomotion et stéréotypies) plus visible après 2 mois.
<i>Heidbreder et al, 1996</i> (Rats)	20mg/kg/jour i.p. pendant 5 jours	20mg/kg +2 jours +12 jours +22 jours	Sensibilisation (locomotion et stéréotypies) croissante avec le temps
<i>Kalivas et Duffy, 1998</i> (Rats)	15mg/kg à j1 puis 30mg/kg de j2 à j5 puis 15mg/kg à j7 i.p.	15mg/kg +2 heures +3 semaines	Sensibilisation (locomotion et stéréotypies)
<i>Cadoni et al, 1999</i> (Rats)	10mg/kg 2 fois par jour i.p. pendant 14 jours	5 ou 10mg/kg +10/14 jours	Sensibilisation (locomotion et stéréotypies) dose dépendante.
<i>Li et al, 2000</i> (Rats)	15mg/kg/jour i.p. pendant 10 jours	15mg/kg +4 jours +10 jours	Sensibilisation (locomotion et stéréotypies)

b. Réponses dopaminergiques à une dose de rappel.

L'observation de l'augmentation de la réponse comportementale suite à une dose de rappel après un sevrage est également accompagnée d'une augmentation de la réponse neurochimique dopaminergique plus importante chez des rats prétraités à la cocaïne par rapport à des rats naïfs (Pontieri et al, 1995 ; Cadoni et al, 1999). Cela a été observé dans les structures contenant les corps cellulaires dopaminergiques (substance noire et aire tegmentale ventrale, Kalivas et al, 1993b) ainsi qu'au niveau des terminaisons dopaminergiques (Kalivas et Duffy, 1993a) mais de façon plus intense dans le noyau accumbens que dans le striatum (Segal et Kuczenski, 1992) et au sein du noyau accumbens de façon plus intense dans le shell que dans le core (Pontieri et al, 1995). Cette libération importante de dopamine atteint son maximum 20 minutes après l'injection de la dose de rappel et revient à des taux normaux après 60 minutes (Kalivas et Duffy, 1993a et b ; Segal et Kuczenski, 1992). L'intensité de la libération de dopamine chez des animaux sensibilisés serait dose dépendante de la dose de rappel (Cadoni et al, 1999) et serait augmentée avec la durée de sevrage (Heidbreder et al, 1996). De plus, elle serait corrélée au niveau des taux de base de dopamine extracellulaire modifiés par la prise répétée de cocaïne (Robertson et al, 1991 ; Weiss et al, 1992a ; Maisonneuve et al, 1995). La sensibilisation neurochimique dopaminergique a été mise en évidence lors de sevrages précoces (+2 jours) dans l'aire tegmentale ventrale mais pas dans le noyau accumbens, et inversement pour un sevrage prolongé (+ 2 semaines) (Kalivas et al, 1992). Ceci est en accord avec le fait que l'initiation de la sensibilisation a lieu au niveau des corps cellulaires dopaminergiques dans l'aire tegmentale ventrale et l'expression a plutôt lieu au niveau des terminaisons dopaminergiques dans le noyau accumbens (Henry et White, 1995).

Ces modifications de la réponse dopaminergique à une dose de rappel de cocaïne sont liées à des modifications de l'activité et de la densité des récepteurs dopaminergiques et des transporteurs. En effet la diminution de la densité des DATs observée dans le noyau accumbens (Pilotte et al, 1994, 1996) et dans l'aire tegmentale ventrale (Cerutti et al, 1994) de +3 à +60 jours de sevrage, pourrait expliquer la forte augmentation de dopamine par un défaut de recapture.

Les récepteurs dopaminergiques participent également à la réponse dopaminergique exacerbée suite à l'administration d'une dose de rappel. En effet, un traitement par des agonistes D1-like ou la combinaison d'agonistes D2-like et d'antagonistes NMDA chez des animaux ayant été prétraités à la cocaïne et donc ayant développé une sensibilisation, peut empêcher l'expression de la réponse neurochimique et comportementale exagérée à une dose de rappel de cocaïne. Un antagoniste des récepteurs D2-like induit, quant à lui, une potentialisation de la sensibilisation comportementale en réponse à une dose de rappel de cocaïne (McCreary et Marsden, 1993 ; Li et al, 2000).

Les récepteurs dopaminergiques participeraient également à la régulation des stéréotypies en réponse à une dose de cocaïne. En effet, un antagoniste des D1-like pendant un traitement à la cocaïne, empêcherait la mise en place de stéréotypies (McCreary et Marsden, 1993).

c. Réponses glutamatergiques à une dose de rappel.

Plusieurs études mettent en évidence l'implication du glutamate dans la sensibilisation. Comme pour la dopamine, il a été mis en évidence que le glutamate est augmenté de façon importante dans le noyau accumbens, en réponse à une injection de cocaïne chez des rats ayant reçu un traitement répétée à la cocaïne (Pierce et al, 1996 ; Reid et Berger ; 1996, Wolf, 1998). Cette sensibilisation neurochimique glutamatergique n'est observée que dans le core du noyau accumbens et serait dépendante de la modification des taux de base extracellulaires glutamatergiques (Baker et al, 2003). Parmi les récepteurs glutamatergiques, les récepteurs ionotropiques, AMPA et NMDA, qui sont impliqués dans les processus de plasticité synaptique, ont une influence sur l'expression de la sensibilisation. L'injection d'un antagoniste AMPA dans le noyau accumbens core après la fin d'un traitement sensibilisant rétabli, chez les animaux sensibilisés, une activité locomotrice comparable à des animaux non sensibilisés après une réinjection de cocaïne à 3 semaines de sevrage. Ceci n'a pas été observé pour les récepteurs NMDA lors de la mesure de la réponse locomotrice chez le rat (Pierce et al, 1996). Cependant, des souris injectées avec un antagoniste NMDA, 30 minutes avant l'injection de cocaïne, montrent une diminution du nombre de stéréotypies mesurées (Karler et al, 1994 ; Wolf, 1998). Les NMDA auraient un rôle spécifique dans la régulation des stéréotypies, qui sont un comportement caractéristique de la sensibilisation comportementale.

4. L'Anticipation de la prise de cocaïne.

Le système mésocorticolimbique est impliqué dans les processus d'apprentissages associatifs et dans les tâches motivationnelles. Les apprentissages associatifs mettent en jeu les neurones dopaminergiques et notamment leur réactivité dans l'anticipation des récompenses (Ikegami et al, 2007). Chez le primate, l'activité neuronale dopaminergique a été mesurée lors de la présentation d'indices préalablement associés à des renforcements positifs. L'activité dopaminergique est diminuée lorsque le renforcement annoncé par la présentation de l'indice de rappel n'est pas délivré tandis qu'elle est augmentée lorsque le renforcement est délivré (Schultz et al, 2008 ; Tobler et al, 2003 ; Waelty et al, 2001). Cette modification de l'activité neuronale dopaminergique en présence ou en absence d'un renforcement annoncé est appelée théorie de la prédiction d'erreur (Schultz et

Dickinson, 2000). Il existe donc une relation entre l'attente d'un renforcement et sa présence, qui se reflète sur l'activité neuronale dopaminergique (Schultz, 2004, 2006).

L'effet renforçant de la cocaïne est très puissant, il sollicite les mécanismes neurobiologiques chargés d'encoder des renforcements naturels et les potentialise de sorte que l'encodage du renforcement de la cocaïne soit exacerbé et que l'individu oriente tout son comportement vers la recherche de drogue.

Chez le rat, après un traitement répété à la cocaïne associé à un contexte conditionnant, la réexposition à ce contexte induit une augmentation spontanée de la locomotion sans réinjection de cocaïne (Brown et al, 1992a et b ; Burechailo et Martin-Iverson, 1996 ; Weiss et al, 2000 ; Duvauchelle et al, 2000b). Ceci montre une anticipation de l'effet renforçant de la drogue, annoncé par le contexte qui se traduit par une anticipation locomotrice. Cependant aucune anticipation dopaminergique n'a été observée lors de l'exposition au contexte.

Néanmoins, l'injection d'une dose de cocaïne dans le contexte conditionnant, provoque une augmentation des taux de dopamine plus importante pour les animaux ayant préalablement été conditionnés au contexte que pour des animaux ayant subi le même traitement à la cocaïne, sans le conditionnement (Fontana et al, 1993 ; Duvauchelle et al, 200a et b). Cette augmentation de la réponse dopaminergique, est associée à une augmentation de l'occupation des récepteurs D1-like et D2-like dans le noyau accumbens (Burechailo et Martin-Iverson, 1996) ainsi qu'à une augmentation de l'expression du gène précoce Fos (marqueur de l'activité cellulaire) dans plusieurs structures tel que le cortex cingulaire, le cortex piriforme, le striatum, les noyaux paraventriculaires et le septum latéral, ont été observées (Brown et al, 1992b). Ces résultats indiquent que l'anticipation de la prise de cocaïne par la présentation du contexte conditionnant induit des modifications de l'activité neurobiologique qui se traduisent par des réponses différentes du système dopaminergique à l'effet renforçant de la cocaïne.

Wheeler et collaborateurs ont pu mettre en évidence une réelle anticipation dopaminergique de l'effet renforçant de la cocaïne par la simple présentation d'indices préalablement associés à la prise de cocaïne. Ils montrent que la présentation d'un indice annonçant la disponibilité de cocaïne induit une augmentation de la dopamine extracellulaire dans le shell du noyau accumbens tandis qu'un indice associé à une solution saline induit une diminution des taux de dopamine dans cette même structure (Wheeler et al, 2011).

Le délai de disponibilité du renforcement annoncé par les indices de rappel a également une influence sur l'anticipation dopaminergique dans le noyau accumbens. En effet, un indice annonçant une disponibilité immédiate de la cocaïne induit une augmentation de la dopamine extracellulaire, tandis que la présentation d'un indice annonçant la disponibilité différée de cocaïne induit une diminution des taux de dopamine extracellulaire dans le shell du noyau accumbens. Les taux de

dopamine dans le noyau accumbens participent à l'anticipation de l'effet renforçant de la cocaïne et peuvent encoder un délai de disponibilité du renforcement (Wheeler et al, 2011).

L'implication de la dopamine dans l'association entre l'effet renforçant de la cocaïne et des indices environnementaux est transitoire car la recherche de cocaïne par la présentation d'indices de rappel peut être bloquée par des antagonistes D1-like (mais pas D2-like) seulement lorsque le conditionnement est en cours d'apprentissage mais pas lorsqu'il devient un réflexe (Choi et al, 2005). De même, l'implication du noyau accumbens est transitoire, car lorsque le conditionnement passe d'un stade d'apprentissage à un stade de comportement réflexe, l'anticipation dopaminergique de l'effet renforçant de la cocaïne n'est plus visible dans le noyau accumbens mais dans le cortex préfrontal (Ikegami et al, 2007).

5. Conclusion.

L'ensemble de ces informations montrent que le système mésocorticolimbique est altéré par des prises répétées de cocaïne.

Bien que les cibles pharmacologiques initiales de ce psychostimulant soient les catécholamines, les autres systèmes de neurotransmetteurs sont également altérés. Nous avons vu ici que les altérations du système dopaminergique jouaient un rôle central dans l'addiction à la cocaïne et qu'elles nécessitent encore d'être comprises. Le système dopaminergique s'inscrit dans un système complexe en interaction avec d'autres neurotransmetteurs qui exercent des régulations réciproques au niveau structurel, cellulaire, neurochimique et moléculaire. Le glutamate, qui est fortement présent dans le système mésocorticolimbique, est connu pour être impliqué dans les processus mnésiques. Après une prise de drogue répétée, des altérations du système glutamatergique contribuent aux différentes perturbations comportementales et neurobiologiques en interaction avec la dopamine.

L'étude des processus neurobiologiques de l'addiction nécessite d'être poursuivie car de nombreuses interrogations persistent sur les mécanismes de mise en place et d'expression de l'addiction.

Les conséquences de la prise répétée de cocaïne décrites dans la littérature présentent de nombreuses disparités tant au niveau comportemental, que neurochimique cellulaire et moléculaire. Les auteurs s'accordent à dire que le profil d'administration utilisé pour chaque étude doit avoir une influence différente dans le système nerveux central. Il est donc primordial de considérer ces différences dans les profils d'administration pour l'interprétation des altérations neurobiologiques.

OBJECTIFS ET HYPOTHESE – PREMIERE PARTIE



L'objectif principal de ce travail de thèse a été de montrer dans la même étude que les adaptations neurobiologiques et comportementales d'une prise répétée de cocaïne dépendent du profil d'administration. Di Chiara et Imperato ont montré en 1988, que l'ensemble des substances psychoactives consommées par l'homme, entraînent une augmentation de la dopamine extracellulaire dans le noyau accumbens. Depuis cette étude une quantité importante de données ont été récoltées pour comprendre l'implication de la dopamine dans la pharmacodépendance. Son rôle dans les processus de mise en place et d'expression de l'addiction à la cocaïne est indiscutable mais malgré le grand nombre d'études les résultats restent confus.

Nous avons donc émis l'hypothèse que les différents résultats obtenus dans la littérature, seraient dus aux différences de protocoles de traitements à la cocaïne employés par les auteurs dans les différents laboratoires. En effet, il a été avancé que le protocole d'administration pouvait avoir une grande importance dans les modifications neurobiologiques induites par les psychostimulants (Weiss et al, 1992a, Unterwald et al, 2001, Bayley et al, 2007). Nous avons donc étudié, dans les mêmes conditions et par une approche pluridisciplinaire les conséquences comportementales, neurochimiques et cellulaires de deux profils d'administration de cocaïne, fréquemment utilisés dans la littérature chez le rat.

Pour chaque profil d'administration, nous avons :

- Déterminé les **modifications centrales et comportementales** après les administrations répétées de cocaïne.
- Evalué l'**anticipation** de l'effet renforçant de la cocaïne.
- Etudié la **réponse à une dose de rappel** de cocaïne

Toutes les études ont été faites après un sevrage court (un jour) et un sevrage long (14 jours).

Les deux profils d'administration de cocaïne utilisés chez le rat sont :

- ➔ **Un profil intermittent** : une injection par jour de cocaïne (20mg/kg i.p.) à 10h, pendant 14 jours.
- ➔ **Un profil binge** : trois injections par jour de cocaïne (20mg/kg i.p.) à 10h, 13h et 16h, pendant 14 jours.

Objectif 1 : Etude des modifications directement induites par l'administration répétée de cocaïne.

- Analyse des modifications de l'activité comportementale basale.
- Analyse des taux de dopamine et de glutamate extracellulaires dans le noyau accumbens core.
- Analyse des modifications de la densité des récepteurs dopaminergiques D1-like et D2-like dans les structures mésolimbiques et nigro-striées.

Objectif 2 : Etude de l'anticipation de l'effet renforçant de la cocaïne, sans présentation d'indices de rappel.

- Mise en évidence d'une anticipation comportementale à l'heure d'injection
- Mise en évidence d'une anticipation neurochimique dans le noyau accumbens core à l'heure d'injection.

Objectif 3 : Etude de la réponse à l'injection d'une dose de rappel de cocaïne.

- Analyse de la réponse comportementale.
- Analyse de la réponse neurochimique dopaminergique et glutamatergique dans le noyau accumbens core.

TRAVAIL EXPERIMENTAL – PREMIERE PARTIE



MATERIEL ET METHODES

Principes et Paramètres des méthodes utilisées :

1. Les animaux.

Dans cette étude nous avons utilisé des rats mâles Sprague-Dawley (Janvier, France), pesant au début des expériences entre 275 et 300g. Les conditions d'hébergement des animaux ont été contrôlées (cycle jour/nuit de 12 heures, température maintenue à 22 ± 1 °C, humidité contrôlée à $50\pm 5\%$). Les animaux ont eu accès à de l'eau et de la nourriture *ad libitum*. Le nombre d'animaux utilisés ainsi que leur degré de souffrance ont été minimisés au maximum pour l'ensemble des expériences menées au cours de cette thèse.

2. Les deux profils d'administration de cocaïne.

Deux profils d'administration de cocaïne ont été choisis afin de comparer leurs conséquences au niveau comportemental, neurochimique et cellulaire.

- Un profil **Intermittent**, consistant en une injection de cocaïne (20mg/kg) par jour pendant 14 jours à 10h du matin exactement (IC).
- Un profil **Binge**, consistant en trois injections de cocaïne (20mg/kg) par jour pendant 14 jours à 10h, 13h et 16h exactement (BC).

La cocaïne hydrochloride (HCl), dissoute dans une solution saline physiologique (0.9% de NaCl) à 20mg/ml a été injectée par voie intrapéritonéale à raison de 1ml/kg par injection.

Parallèlement des groupes d'animaux contrôles ont reçu des injections de solution saline dans les mêmes conditions que les animaux traités avec la cocaïne (IS et BS). Les animaux ont été systématiquement remis dans leur cage d'habitation, immédiatement après chaque injection. La répartition des rats dans les différents groupes s'est faite de façon aléatoire.

3. Analyse des conséquences comportementales.

a. Mesure de la locomotion par actimétrie

Principes :

Cette méthode d'analyse comportementale de la locomotion est réalisée à l'aide d'un actimètre (Immetronic, France). Le principe de cet appareil est d'évaluer l'activité locomotrice générale des animaux tout en les laissant dans un environnement contenant de la nourriture et de l'eau *ad libitum* et sans aucune intervention ni présence de l'expérimentateur. Le dispositif comprend huit cages

d'habitation (34x21x19cm) avec une faible luminosité (<5 lux), traversées par des rayons infrarouge qui comptabilisent les déplacements horizontaux et verticaux des animaux lorsqu'ils sont interrompus. Le cycle jour/nuit de 12h/12h est respecté. Chaque animal est placé dans une cage et les déplacements sont comptabilisés.

Méthodes :

Les animaux sont placés un par cage dans les cages de l'actimètre. Leur locomotion est comptabilisée pendant toute la durée de l'expérience avec un total des déplacements heure par heure.

Analyses statistiques :

Une analyse des variances à un facteur (ANOVA) a été utilisée pour étudier l'activité locomotrice en réponse à une injection de rappel de cocaïne. Pour l'analyse de la locomotion mesurée pendant 24 heures sans être sous l'effet de la drogue, c'est une ANOVA à deux facteurs qui a été utilisée (profil d'administration x temps). $P < 0.05$ a été choisi comme seuil de significativité. Un test de Bonferroni a été choisi pour réaliser les analyses post-hoc.

b. Evaluation comportementale par Open field.

Principes :

L'open field est un paradigme expérimental utilisé pour mesurer l'activité générale des animaux (locomotrice, exploratoire) dans un environnement nouveau. Il est constitué d'une enceinte rectangulaire (90x70x60cm), divisée au sol par des carreaux de 10 cm chacun. Le comportement de l'animal est analysé pendant la durée où l'animal se trouve dans l'open field.

Méthodes :

Les animaux sont placés dans l'open field, tournés vers un des coins de l'enceinte. Le nombre de carreaux traversés, de redressements, de toilettages et de défécations sont comptabilisés pendant 6 minutes. Pour les rats sous cocaïne, le nombre de comportements stéréotypés ont également été comptabilisés. A la fin des 6 minutes, les animaux sont replacés dans leurs cages d'habitation.

Analyses statistiques :

La comparaison de l'activité exploratoire, mesurée après l'injection d'une dose de rappel de cocaïne, a été faite par ANOVA à un facteur. Pour la comparaison de réponse en stéréotypies, une ANOVA à deux facteurs a été réalisée (profil d'administration x temps après l'injection de rappel). $P < 0.05$ a été

choisi comme seuil de significativité. Un test de Bonferroni a été choisi pour réaliser les analyses post-hoc.

4. Analyse des conséquences neurochimiques

- a. La microdialyse intracérébrale *in vivo* sur rats vigiles.
 - i. Implantation de canules guides par stéréotaxie.

Principes :

Cette méthode de chirurgie consiste en l'implantation d'une canule intracérébrale au-dessus de la structure d'intérêt grâce à un atlas des coordonnées tridimensionnelles du cerveau Paxinos and Watson (1998). Cette chirurgie se pratique à l'aide d'appareils stéréotaxiques où le rongeur anesthésié est fixé à l'appareillage au niveau de sa mâchoire supérieure et de ses orifices inter-auraux. Les repères des coordonnées sont basés sur les sutures crâniennes des os frontaux, pariétaux et occipitaux (figure 12.).

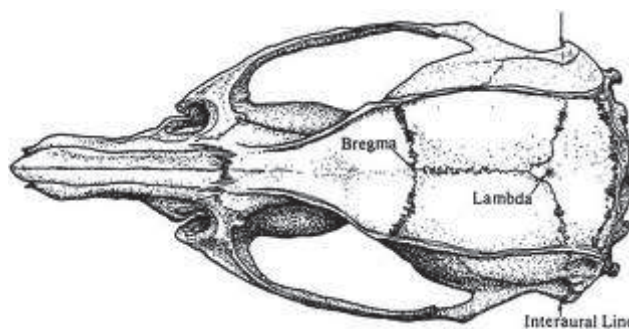


Figure 12. Dessin des sutures crâniennes de rongeur.

L'intersection des sutures des os pariétaux et frontaux forme le point de coordonnée bregma et l'intersection des sutures des os pariétaux et occipitaux, forme le point de coordonnée lambda (Paxinos et Watson, 1998).

Méthodes :

Les rats ont été anesthésiés par une injection en intrapéritonéale d'une solution de Kétamine/Xylazine (80/10mg/kg) et placés sur l'appareil stéréotaxique (Unimécanique). Après détermination des coordonnées de bregma, les canules guides (CMA 12, Phymep, France) ont été implantées dans le noyau accumbens core (les coordonnées tirées de l'atlas de Paxinos et Watson, (1998) sont +1,6 mm bregma selon l'axe antéropostérieur, +1,4mm bregma selon l'axe mediolatéral, et -6mm en dessous de la surface crânienne). La canule est ensuite fixée au crâne à l'aide de ciment dentaire (Dentalon, Heraeus) de façon permanente. Une fois la chirurgie terminée, les animaux ont

recupéré pendant une semaine, avant le début des expérimentations. Le positionnement correct des canules dans le noyau accumbens a été vérifié systématiquement pour chaque rat.

ii. La microdialyse intracérébrale *in vivo*.

Principes :

La microdialyse intracérébrale consiste à perfuser de façon continue et constante du liquide extracellulaire cérébral artificiel au travers d'une sonde de dialyse implantée dans une structure d'intérêt le temps de l'expérimentation. Les sondes utilisées pour la microdialyse sont composées en partie terminale d'une membrane de diffusion qui permet l'échange de petites molécules du milieu extracellulaire vers le milieu intérieur de la sonde (Figure 13). La récolte de microdialysats permet d'obtenir du liquide extracellulaire cérébral contenant un échantillon représentatif de la quantité de neurotransmetteurs présents au niveau extracellulaire dans la structure d'intérêt, pendant la période de recueil.

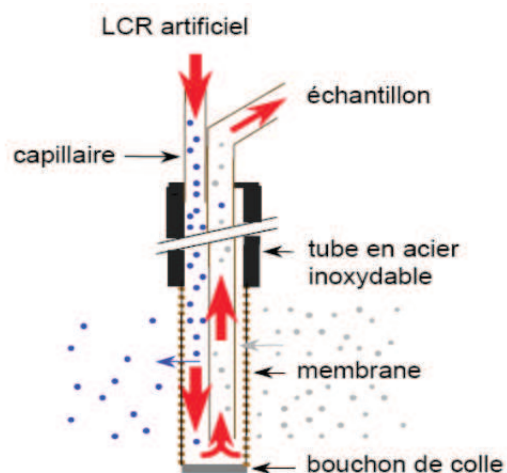


Figure 13. Schéma d'une sonde de microdialyse.

Les flèches épaisses représentent la perfusion du LCR artificiel. Les molécules endogènes (points gris) diffusent à travers la membrane selon leur gradient de concentration.

Méthodes :

Le jour de la microdialyse, le stylet est retiré de la canule guide et une sonde (CMA 12 Ellit, 2mm, Phymep, France), dont la membrane dépasse de 2mm de la canule guide dans le noyau accumbens core, est implantée aux rats vigiles (figure 14). La membrane est perfusée de façon continue à un

débit de 2µl/min avec du liquide extracellulaire cérébral artificiel (composition en mM : NaCl 140, KCl 4, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 0.1, Na₂HPO₄ 1.9 et CaCl₂ 1.2 (pH = 7.4)). Après deux heures d'équilibration de la membrane de microdialyse, des échantillons ont été prélevés pendant une durée de 30 minutes chacun (donnant des microdialysats de 60µl de volume final).

Les prélèvements pour les microdialysats servant à doser la dopamine ont été faits dans des tubes contenant 5µl d'HClO₄ (0,4M), afin de prévenir l'oxydation de ce neurotransmetteur. Pour le glutamate cette précaution n'était pas nécessaire. Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'au moment de leur utilisation.

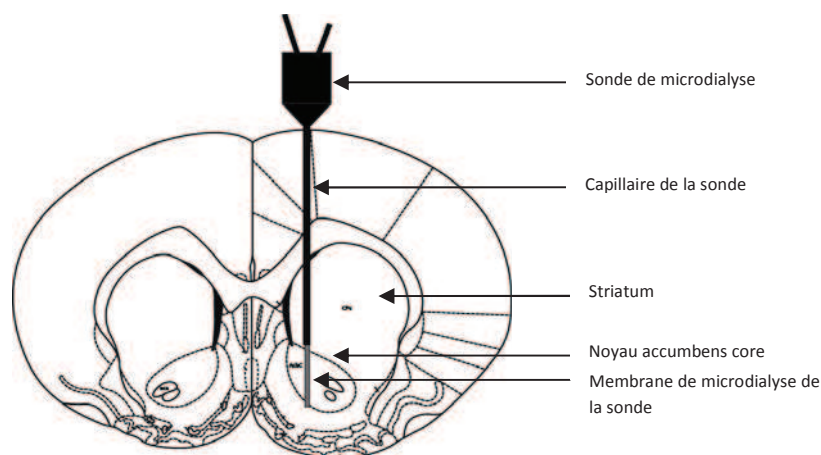


Figure 14. Schéma de localisation de la sonde de microdialyse pendant les prélèvements.

Coupe coronale de rat, bregma +1,6mm, atlas Paxinos et Watson, 1998.

- b. Dosage des neurotransmetteurs dans les microdialysats par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à de la coulométrie.

Principes :

La chromatographie liquide à haute performance (figure 15.) est une méthode de séparation et de purification d'un ou plusieurs composés (les solutés) présents dans un échantillon en vue de les identifier et de les quantifier. Elle est constituée classiquement de deux phases : une phase stationnaire composée d'une colonne de séparation de diamètre variable et d'une phase mobile composée d'une solution de solvants. Deux combinaisons de phases peuvent être utilisées : une en phase normale et une en phase inverse. En phase normale, la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est apolaire tandis qu'en phase inverse, la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile est polaire, le plus souvent c'est en phase inverse que sont faites les séparations. La colonne contenant la phase stationnaire est également composée d'un volume mort qui est traversé par la phase mobile. L'échantillon à analyser est injecté dans la phase mobile et est propulsé à haute

pression en parcourant tout le système chromatographique. Les composés se trouvent alors répartis le long de la colonne selon leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile et sont élués avec des temps de rétention et des concentrations variables propres à leur composition. La colonne est souvent constituée de parois de silice à laquelle sont accrochées des chaînes de carbone, apportant ses propriétés apolaires à la colonne. La phase mobile polaire est constituée de solvants organiques polaires dissous dans un tampon dont le pH est déterminé afin d'être favorable à la bonne séparation des constituants d'un échantillon.

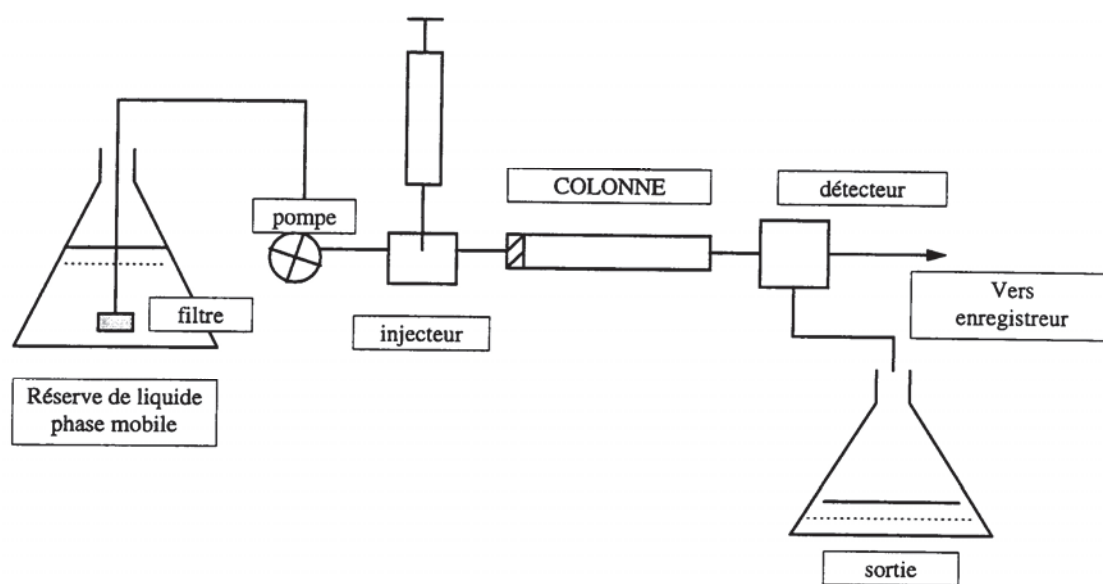


Figure 15. Principe de fonctionnement de l'HPLC.

L'échantillon à doser est injecté dans le circuit contenant la phase mobile. L'échantillon passe ensuite dans la colonne de séparation et chaque molécule est éluée avec un temps de rétention spécifique à ses propriétés physicochimiques et son affinité pour la phase mobile (polaire) et pour la colonne (apolaire). La modification du potentiel, induite par des réactions d'oxydoréduction pour chaque molécule est comptabilisée par le détecteur au niveau des cellules de lectures (coulochem) et l'enregistreur traduit cette modification de potentiel en chromatogramme.

La coulométrie est une méthode de mesure physico-chimique basée sur le principe de quantification du potentiel électrique (ou courant) nécessaire à l'oxydation ou à la réduction d'un composé présent dans une solution.

A la sortie de la colonne de séparation, le circuit est muni d'une cellule de travail constituée de deux électrodes. Ces électrodes sont maintenues à des potentiels constants, induisant une différence de potentiel entre les deux électrodes. Ces paramètres sont choisis afin de permettre l'oxydation ou la réduction de l'ensemble de la molécule à doser. C'est le courant (quantité d'électrons présents), représentatif du niveau d'oxydo/réduction dans le solvant qui est mesuré en temps réel. La phase mobile circulant dans le circuit est maintenue à un courant constant grâce à une cellule de garde.

Lors du passage d'un soluté, la modification du courant est mesurée par les électrodes. Une fois que le substrat est totalement réduit, le courant retourne à sa valeur initiale.

La différence de potentiel électrique mesurée lors du passage du soluté dans la cellule est traduite par le Coulochem (Coulochem III, Esa, Inc.) en chromatogramme (figure 16). Le pic représentant la molécule d'intérêt est identifié grâce à son temps de rétention, spécifique à chaque soluté. Le temps de rétention est déterminé au préalable, grâce au passage dans le circuit chromatographique d'un échantillon ne contenant que la molécule standard.

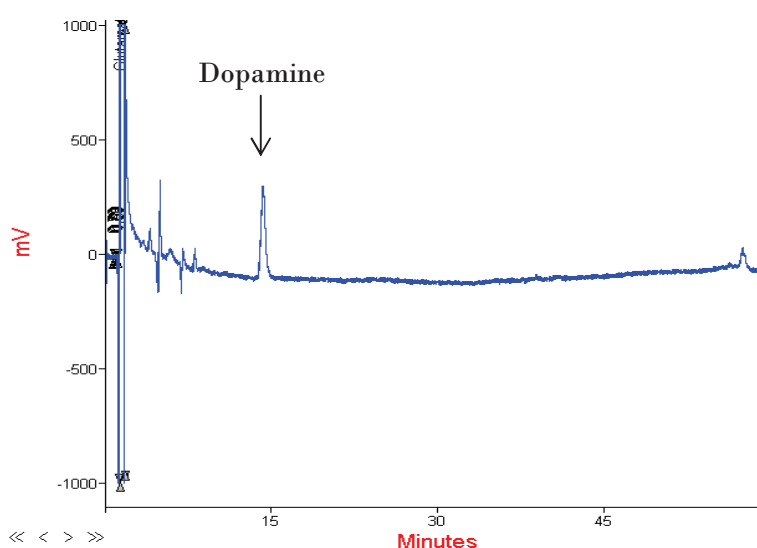


Figure 16. Chromatogramme d'un microdialysat pour le dosage de la dopamine.

Les pics observés représentent chacun une molécule éluée par la colonne. Le temps de rétention de la dopamine est de 15 minutes environ.

Méthodes utilisées pour le dosage de la dopamine et du glutamate :

- La dopamine.

La dopamine est une catécholamine ayant des propriétés d'oxydoréduction naturelles. Elle est présente naturellement et de façon physiologique sous sa forme réduite et peut, selon son activité, être passée sous sa forme oxydée par la cession de deux électrons (figure 17).

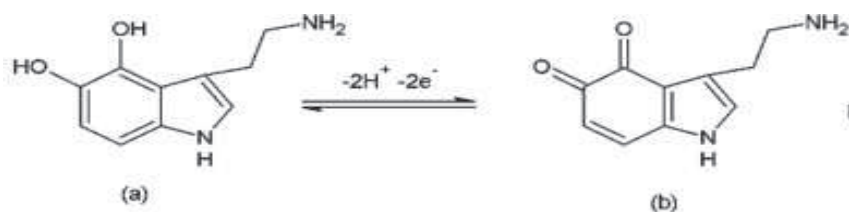


Figure 17. Couple Redox de la dopamine (d'après Tang, Kumar et Chen, 2008.)

La Phase mobile pour le dosage de la dopamine :

La phase mobile pour le dosage de la dopamine était constituée de 0,15M (20,7g) de Sodium dihydrogène phosphate (NaH_2PO_4), 3mM (0,865g) de Sodium dodécyl sulfate ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$), 5mM (1g) d'acide citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), 0,5mM d'EDTA, et de 10 % de Methanol et 15% d'Acétonitrile. Le volume final était complété à 1L avec de l'eau milliQ (Millipore) et ajusté à un pH =5.6 avec de la soude à 1M. La phase mobile était ensuite filtrée sur membrane polaire (0,22 μm), puis dégazée pendant 30 minutes.

Potentiel des cellules :

La cellule de garde : +450mV, La cellule E1 : -125mV, La cellule E2 : +375mV.

Lors du dosage, le débit de la pompe était réglé à 0.8ml/min et le volume d'échantillon injecté était de 40 μl pour un volume mort de 17 μl .

La limite de détection de notre méthode était de 0.5×10^{-10} M.

- Le glutamate et le GABA.

Le glutamate et le GABA sont des neurotransmetteurs acides aminés, par conséquent ils ont des propriétés oxydo-réductrices très faibles (figure 18). Il est donc nécessaire d'augmenter leur potentiel oxydoréducteur par l'ajout d'un agent dérivatisant, ce qui les rend détectables. L'o-phthalaldéhyde (OPA) est une molécule ayant la propriété d'interagir avec les acides aminés en présence de thiols et qui possède deux sites d'oxydation par ses deux groupes formyles (figure 18).

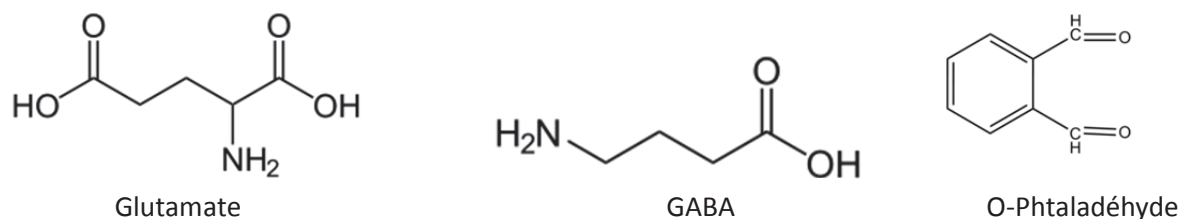


Figure 18. Formule du glutamate, du GABA et de l'agent dérivatisant, l'O-phthalaldéhyde (OPA).

La phase mobile pour le dosage du glutamate et du GABA :

La phase mobile de glutamate était constituée de 20% de méthanol, de 0,1M de sodium phosphate monobasique et de 0,5mM d'EDTA. Le pH était ajusté à 4.5 unités pH avec de l'acide phosphorique (1M). Elle était ensuite filtrée sur membrane polaire (0,22µm), puis dégazée pendant 30 minutes.

Potentiel des cellules :

La cellule de garde : +700mV, La cellule E1 : +500mV, La cellule E2 : +700mV.

Lors du dosage, le débit de la pompe était réglé à 0.65ml/min et le volume d'échantillon injecté était de 20µl pour un volume mort de 7µl.

La limite de détection de notre méthode était de 5×10^{-8} M.

La dérivatisation (Méthode d'après Rowley et al, 1995) :

22mg d'OPA ont été dissous dans 0,5ml de sodium sulfite (0,03M). Les sulfites ont ensuite été précipitées avec 0,5ml d'éthanol absolu et a cette solution ont été rajoutés 0,9ml de sodium tetraborate (0,1M, pH =10.4, ajusté avec de la soude à 5M). Cette solution est conservée à l'abri de la lumière et renouvelée toutes les 12 heures. Pour la procédure de dérivatisation, 30µl d'échantillon auxquels sont ajoutés 0,6µl d'OPA sont incubés pendant 15 minutes à 37°C.

Lors du dosage, le débit de la pompe était réglé à 0.35ml/min. Le volume d'échantillon injecté était de 20µl pour un volume mort de 3 µl.

Analyses statistiques :

L'analyse des données neurochimiques dans les conditions sans être sous l'effet de la drogue (taux de base et taux à l'heure d'injection) ont été faites par comparaison de moyennes avec le test *t* de Student.

Une ANOVA à deux facteurs a été utilisée pour l'analyse des taux de dopamine dans le noyau accumbens en réponse à l'injection d'une dose de rappel de cocaïne (profil d'administration x

temps). $P < 0.05$ a été choisi comme seuil de significativité. Un test de Bonferroni a été réalisé pour les analyses post-hoc.

5. Analyse de la variation de la densité des récepteurs dopaminergiques.

Principes :

L'analyse de la variation des récepteurs a été faite par autoradiographie. Cette méthode se base sur le principe de détection de ligands radiomarqués (le radioligand), spécifiques de chaque famille de récepteurs, mis en présence de coupes de tissus cérébraux contenant les structures à analyser. Une partie des coupes est incubée uniquement avec le radioligand pour le marquage total et une autre partie est incubée avec le radioligand et un ligand froid compétitif afin de ne révéler que les sites de liaison non spécifiques. Une soustraction des deux signaux permet de déterminer le signal spécifique émis par les ligands liés aux récepteurs.

La mesure du signal a été quantifiée par comptage des coups par minutes émis par les coupes, grâce à un beta-imager

Méthodes :

Le jour où les variations de la densité des récepteurs ont voulu être mesurées, les rats ont été sacrifiés par décapitation après intoxication au CO_2 . Les cerveaux ont été prélevés et congelés immédiatement dans de l'isopentane (-35°C). Des coupes coronales de $20\mu\text{m}$ d'épaisseur ont été réalisées au cryostat (Jung frigocut 2800N, Leica, Allemagne) et montées sur des lames Superfrost Plus (Menzel Gläser, Allemagne) puis stockées à -20°C .

Pour les récepteurs D1-like : les lames contenant les coupes de cerveaux ont été pré-incubées dans un tampon Tris-HCl 50mM (120mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 et 100mM de ketanserine (pour bloquer les sites des récepteurs 5HT2 non spécifiques) pH 7.4) pendant 30 minutes à 25°C . Ensuite, une partie des coupes a été incubée dans le même tampon contenant 1nM de $[3\text{H}]\text{-SCH23390}$ (Perkin Elmer, France) pour le marquage total. Une autre partie a été incubée avec ce même tampon contenant le $[3\text{H}]\text{-SCH23390}$, ainsi que $10\mu\text{M}$ de SKF-38393 (Sigma-Aldrich, France) pour le marquage non spécifique des coupes.

Pour les récepteurs D2-like : les lames contenant les coupes de cerveaux ont été pré-incubées dans un tampon Tris-HCl 50mM (120 mM NaCl et 5 mM KCl, pH 7.4) pendant 30 minutes à 25°C . Ensuite, une partie des coupes est incubée dans le même tampon contenant 2nM de $[3\text{H}]\text{-raclopride}$ (Perkin Elmer, France) pour le marquage total. Une autre partie est incubée avec ce même tampon

contenant le [3H]-SCH23390, ainsi que 10 μ M de 2-bromoalpha-ergocryptine (Sigma-Aldrich, France) pour le marquage non spécifique des coupes.

Les lames ont ensuite été incubées pendant 60 minutes à 25°C. Après cette période d'incubation, les lames ont été rincées dans le tampon de pré-incubation pendant 5 minutes à température ambiante et ont été laissées à l'air libre jusqu'à ce qu'elles sèchent totalement.

L'analyse de la liaison de ligand a été faite à l'aide d'un β -Imager (β -Imager TM2000, Biospace Instruments, France) selon le protocole décrit par Poisnel et collaborateurs (2006). Les lames ont été recouvertes avec une feuille d'aluminium (3M, Dicgem, Belgique) afin d'appliquer une différence de potentiel suffisante entre les lames et la chambre du β -Imager. Elles ont ensuite été placées dans la chambre à gaz, mélange d'argon (Air liquid, France) et de tiéthylamine (Sigma Aldrich, Sigma, USA) du détecteur. Les lames ont été exposées aux gaz pendant 24h à 48h. La limite de détection et de résolution était de 0.07coups par minute (cpm) et 100 μ m respectivement.

Les niveaux de radioactivité pour chaque aire cérébrale ont été déterminés par comptage du nombre de particules β en provenance de chaque zone délimitée par le logiciel β -vision (4.2, Biospace Instruments, France). Le signal de radioligand a été exprimé en coups par minutes par mm² (cpm/mm²). La liaison spécifique a été déterminée par soustraction entre la liaison totale et la liaison non spécifique.

Analyses statistiques :

La comparaison des variations de la densité des récepteurs des récepteurs a été faite par comparaison des moyennes entre les animaux prétraités à la cocaïne et leurs contrôles avec le test *t* de Student. $P < 0.05$ a été choisi comme seuil de significativité.

Procédures expérimentales :

1. Etude des modifications directement induites par l'administration répétée de cocaïne.

Après les 14 jours de traitement selon les deux profils d'administration de la cocaïne, les conséquences comportementales, neurochimiques et cellulaires ont été analysées après 1 jour ou 14 jours de sevrage.

- Mesure des modifications de l'activité locomotrice (figure 19):

Mesure de la locomotion après 1 jour de sevrage : les animaux ont été placés dans l'actimètre 2h après la dernière injection de chaque traitement. Leur locomotion générale et spontanée a été mesurée pendant 24 heures sans intervention de l'expérimentateur.

Mesure de la locomotion après 14 jours de sevrage : le même protocole qu'après un jour de sevrage a été utilisé. Les animaux ont été placés dans les cages d'actimètre le 27^{ème} jour, deux heures après l'heure de la dernière injection 14 jours avant.

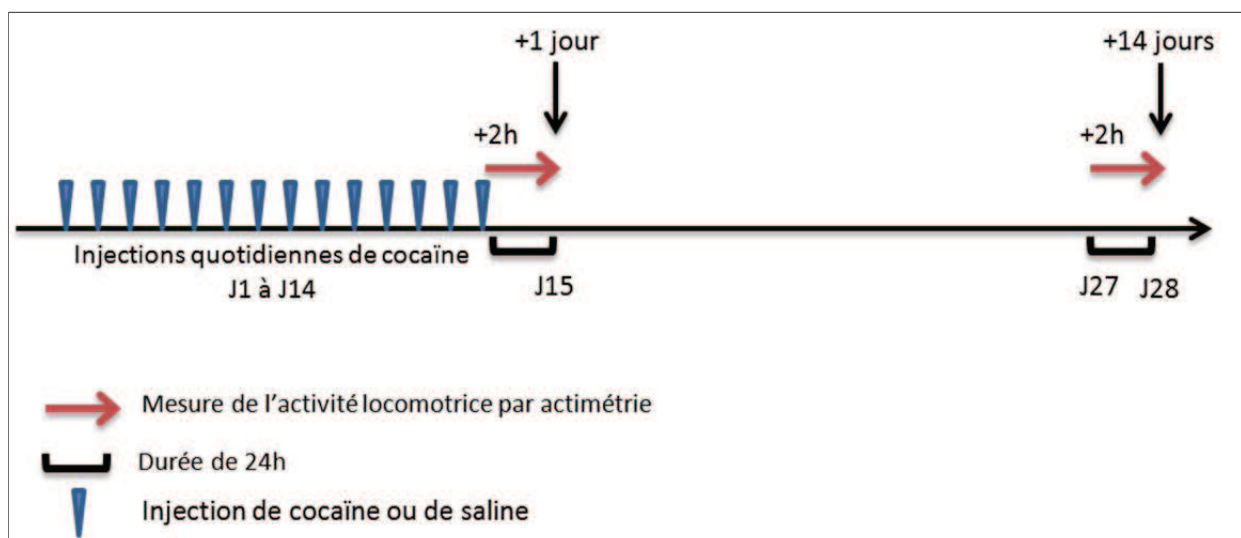


Figure 19. Procédure de mesure de l'activité locomotrice après les traitements.

- Mesure des modifications des taux de base de dopamine et de glutamate extracellulaires dans le noyau accumbens core (figure 20) :

Un jour et 14 jours après la fin des deux profils d'administration, deux microdialysats ont été prélevés pour chaque groupe, à des heures qui ne correspondent pas aux heures auxquelles les animaux ont eu l'habitude de se faire injecter.

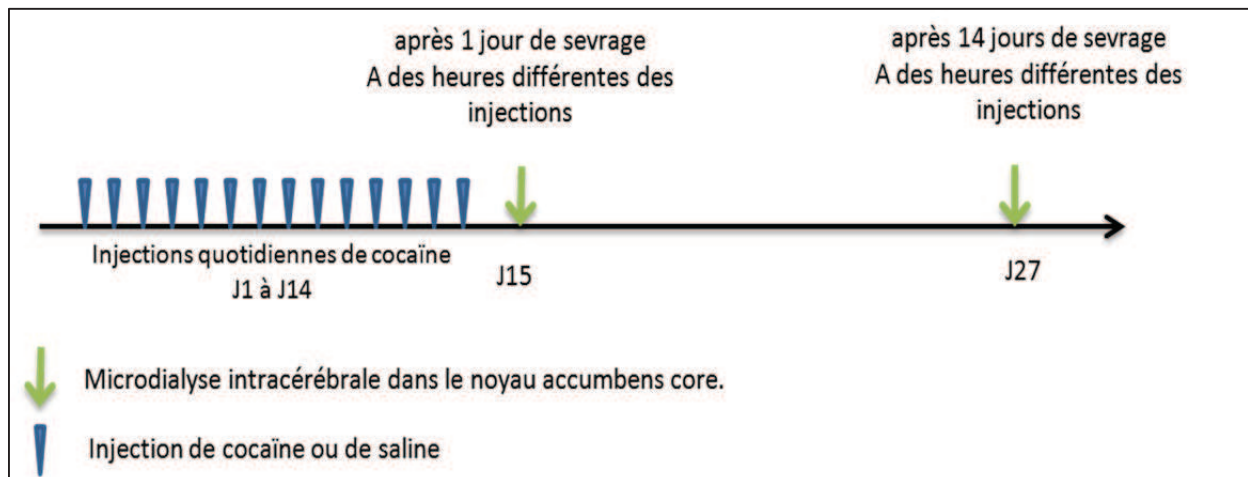


Figure 20. Procédure de mesure de la variation des taux de neurotransmetteurs basaux après les traitements.

- Mesure de la variation de la densité des récepteurs D1-like et D2-like (figure 21).

Après les 14 jours de traitement selon les deux profils d'administration, d'animaux non implantés. Les animaux ont été sacrifiés après 1 jour ou 14 jours de sevrage pour l'analyse de la variation de la densité des récepteurs dans la substance noire, l'aire tegmentale ventrale, le striatum et le noyau accumbens.

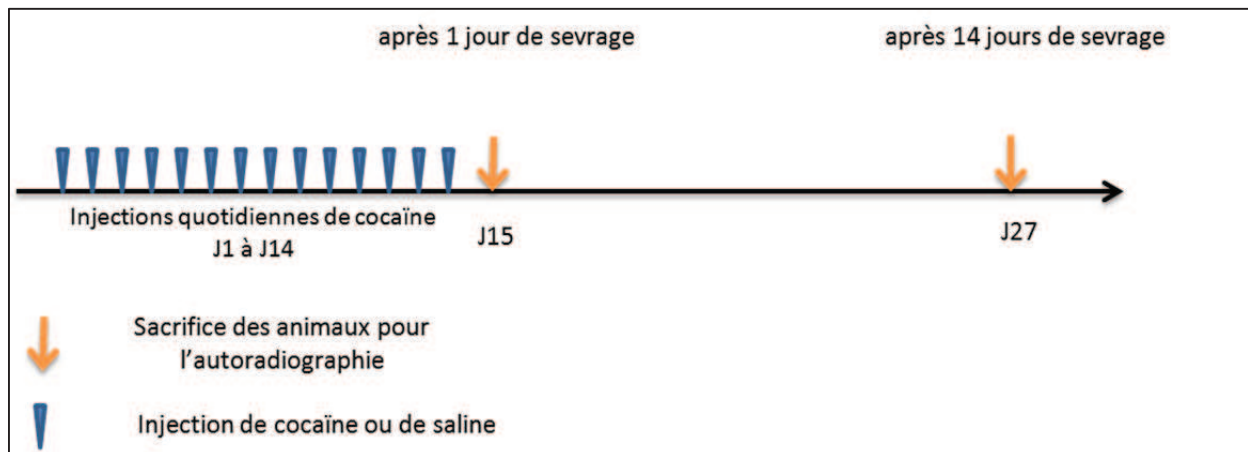


Figure 21. Procédure de mesure de la variation de la densité des récepteurs dopaminergiques après les traitements.

2. Etude de l'anticipation de l'effet renforçant de la cocaïne à l'heure d'injection sans présentation d'indices de rappel.

Après les 14 jours de traitement selon les deux profils d'administration de la cocaïne, l'anticipation neurochimique a été analysée après 1 jour ou 14 jours de sevrage.

- Mesure des taux de dopamine et de glutamate extracellulaire dans le noyau accumbens core, à l'heure à laquelle les animaux ont eu l'habitude de recevoir la cocaïne (figure 22).

Mesure des taux de base à l'heure d'injection après un jour de sevrage : 22h après la fin des traitements (8h du matin pour les intermittents et 14h pour les binge), les animaux sont placés dans le dispositif de microdialyse pour les deux heures d'équilibration de la sonde. Exactement 24h après la dernière injection, deux microdialysats ont été recueillis, afin d'avoir le taux de dopamine et de glutamate extracellulaire au moment de l'heure d'injection.

Mesure des taux de base à l'heure d'injection, après 14 jours de sevrage : le même protocole qu'après un jour de sevrage a été utilisé. Les animaux ont été placés dans le dispositif de

microdialyse le 27ème jour, deux heures avant l'heure de la dernière injection, qui a eu lieu 14 jours avant. Après les 2h d'équilibration, deux microdialysats ont été recueillis, afin d'avoir le taux de dopamine et de glutamate extracellulaire au moment de l'heure d'injection.

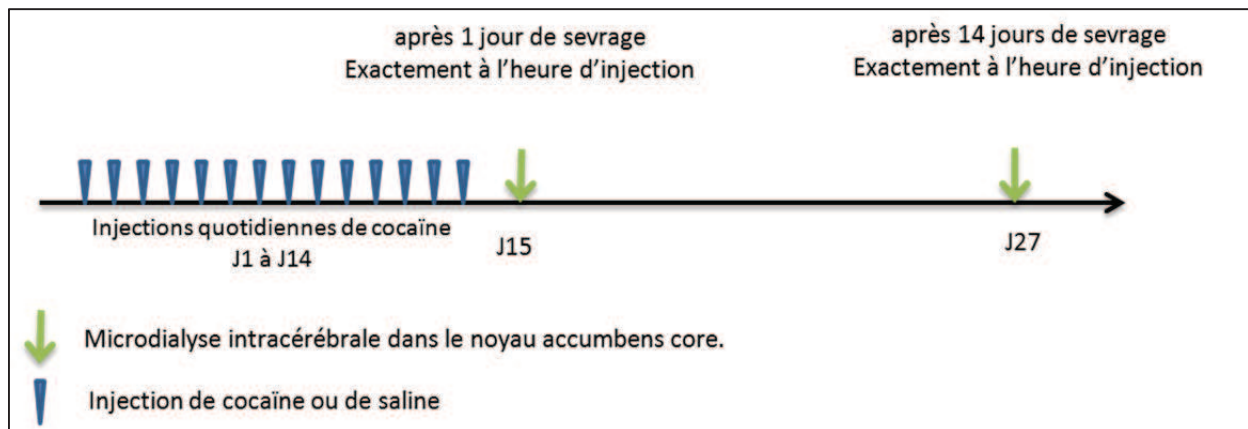


Figure 22. Procédure de mesure de la variation des neurotransmetteurs lors de l'anticipation.

3. Etude de la réponse à l'injection d'une dose de rappel de cocaïne

Après les 14 jours de traitement selon les deux profils d'administration de la cocaïne, la réponse neurochimique et comportementale à une injection de dose de rappel de cocaïne a été analysée après 1 jour ou 14 jours de sevrage.

- Mesure de la réponse locomotrice à une dose de rappel de cocaïne, après 1 jour et 14 jours de sevrage (Figure 23) :

Nous avons évalué la réponse locomotrice des animaux à une injection de cocaïne (20mg/kg i.p.) ou de solution saline. L'injection de la dose de rappel de cocaïne a été faite à des heures différentes des heures auxquelles les animaux étaient injectés pendant les traitements. Les animaux ont été placés dans l'actimètre immédiatement après l'injection, et leur locomotion a été mesurée pendant une heure.

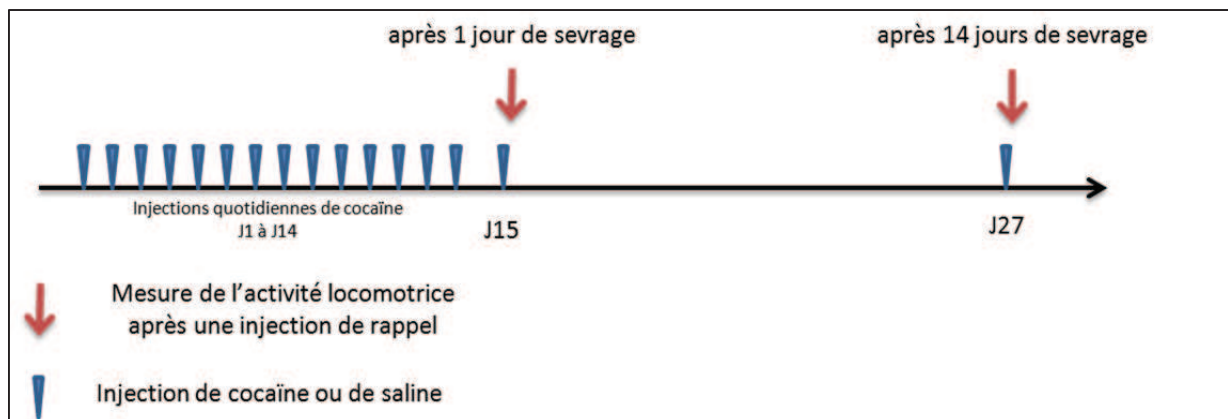


Figure 23. Procédure de mesure de la réponse locomotrice à une dose de rappel de cocaïne.

- Mesure de la réponse dopaminergique et glutamatergique à une dose de rappel de cocaïne dans le noyau accumbens core après 1 jour et 14 jours de sevrage (Figure 24):

Afin de mesurer la réponse neurochimique à l'injection d'une dose de rappel de cocaïne dans le noyau accumbens core, nous avons placé les animaux dans le dispositif de microdialyse après 1 jour ou 14 jours de sevrage à des heures qui ne correspondent pas aux heures auxquelles les animaux avaient l'habitude d'être injectés pendant les traitements. Après les deux heures d'équilibration, deux premiers microdialysats de 30 minutes ont été recueillis pour obtenir les taux de base de dopamine ou de glutamate. Ensuite, immédiatement après une injection de cocaïne (20mg/kg) ou de solution saline, deux autres microdialysats de 30 minutes ont été recueillis.

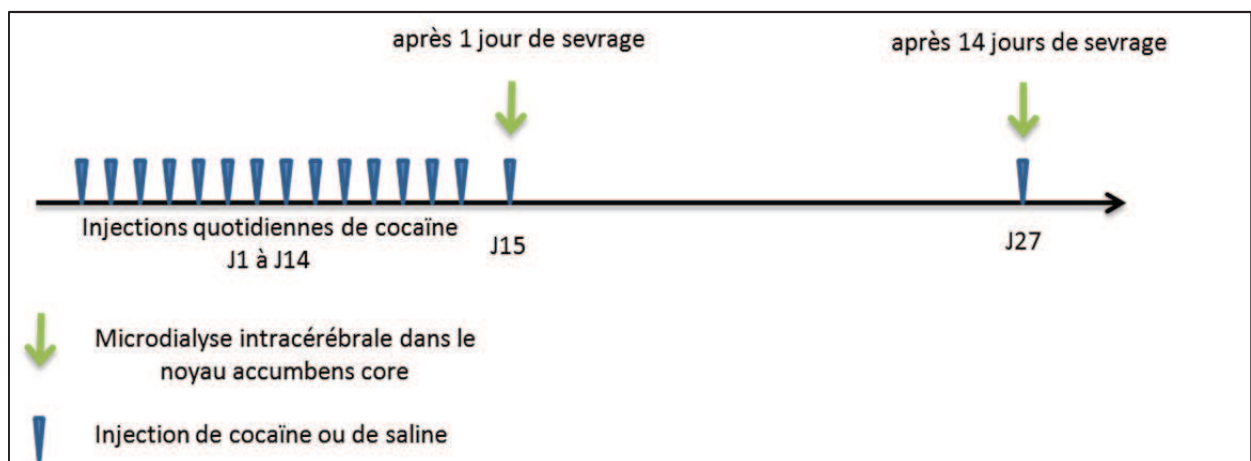


Figure 24. Procédure de mesure de la réponse neurochimique à une dose de rappel de cocaïne.

4. Précaution mise en œuvre pour l'ensemble des expérimentations menées pour cette étude.

Dans le but d'exclure tout effet lié à l'association entre l'effet renforçant de la drogue et des indices environnementaux, les traitements à la cocaïne ont été réalisés dans une pièce différente de la pièce de microdialyse.

RESULTATS

Objectif 1 : Etude des modifications induites par l'administration répétée de cocaïne.

Le but de cette étude a été de comparer les conséquences comportementales, neurochimiques et cellulaires induites par deux profils d'administration différents de cocaïne.

Nous avons analysé les modifications induites par le profil intermittent et par le profil binge sur l'activité locomotrice, sur les taux basaux de dopamine extracellulaire dans le noyau accumbens core et sur la densité des récepteurs dopaminergiques dans les voies dopaminergiques centrales.

Les études ont été réalisées après un sevrage court (+1 jour) et après un sevrage long (+14 jours).

1. Activité locomotrice spontanée.

La mesure de l'activité basale par actimètre en dehors des heures habituelles d'injection, n'a pas montré de différence de la locomotion entre les animaux prétraités avec de la cocaïne selon le profil intermittent (Figure 25a et b) ou selon le profil binge (Figure 25c et d) par rapport à leurs contrôles respectifs, IS et BS.

La figure 25d montre une augmentation de la locomotion 27 jours après le début du traitement pour le profil binge cocaïne par rapport à leurs contrôles saline entre les points +4h et +10h. Cette augmentation n'est cependant pas significativement différente du groupe traité avec du sérum physiologique.

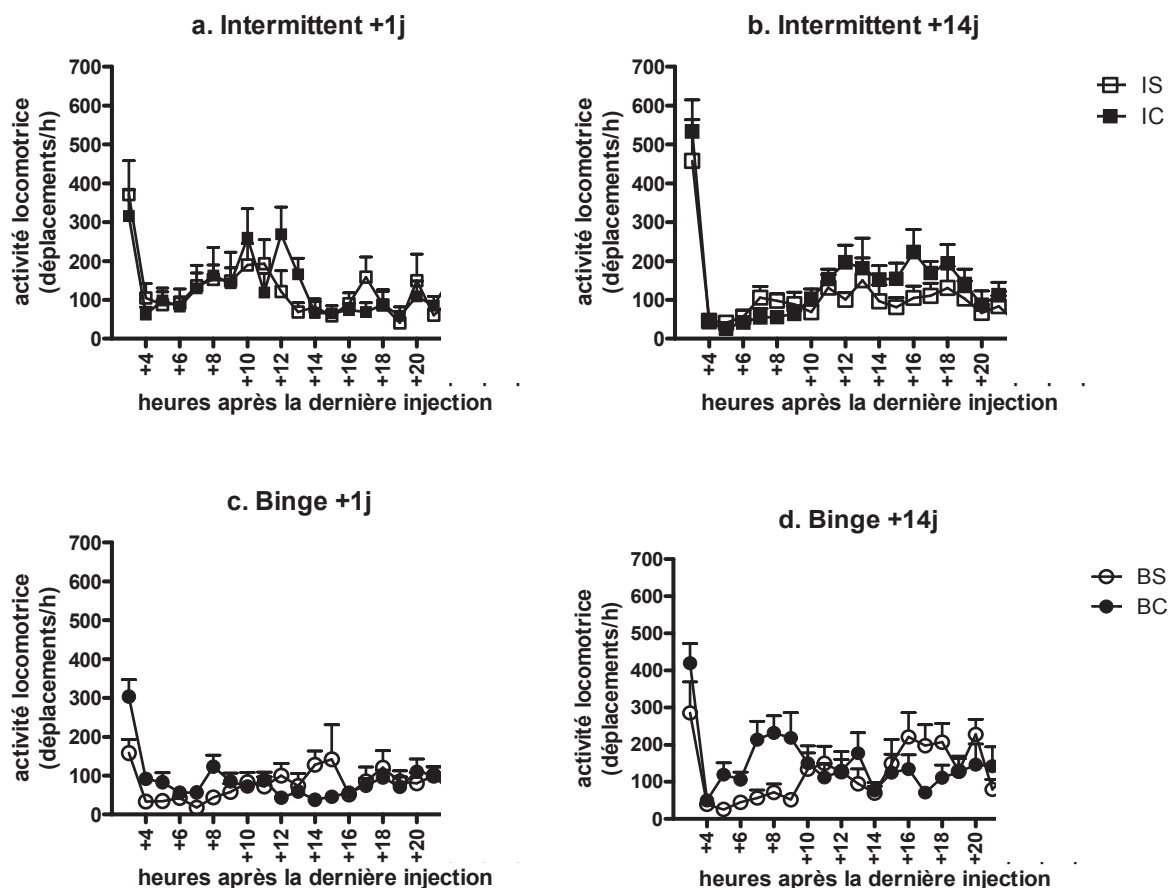


Figure 25. Activité locomotrice spontanée.

L'activité locomotrice a été mesurée en dehors des heures habituelles d'injection, après 1 jour (a et c) et 14 jours de sevrage (b et d). Les animaux ont été placés dans l'actimètre 2 heures après la dernière injection des traitements. Les résultats sont exprimés en déplacements par heure (moyenne \pm SEM). * $p < 0.05$, ANOVA à deux facteurs et test post-hoc de Bonferroni, ($n = 9$ to 14). I : intermittent; B : binge; IS : intermittent saline; IC : intermittent cocaïne; BS : binge saline; BC : binge cocaïne.

2. Taux de dopamine extracellulaire dans le noyau accumbens core.

Les taux basaux de dopamine extracellulaire ont été évalués dans le noyau accumbens core par microdialyse intracérébrale chez des rats éveillés. Cette mesure a été réalisée à des heures qui ne correspondent pas aux heures d'injection habituelles de cocaïne pour chaque profil d'administration. La figure 26 montre que l'analyse par comparaison des moyennes (test t de Student) met en évidence une diminution des taux de base de dopamine, après un jour de sevrage pour les IC et pour les BC, par rapport à leurs contrôles respectifs, IS et BS (Figure 26a, IC: $n=15$, $t_{(13)}=2.49$, $p<0.05$; BC $n=13$, $t_{(11)}=2.50$, $p<0.05$). Cet effet persiste après 14 jours de sevrage pour le profil IC (+ 14 jours, Figure 26b, $n=15$, $t_{(13)}=2.57$, $p<0.05$). Pour le profil binge, les taux de base de dopamine ne sont plus différents entre les BC et les BS après 14 jours de sevrage.

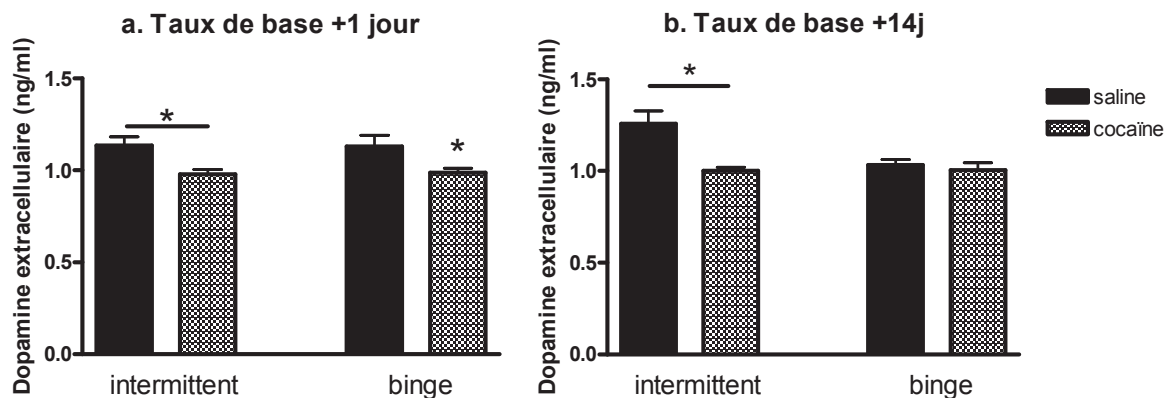


Figure 26. Taux de dopamine extracellulaire après 1 jour et 14 jours de sevrage.

Les taux de base de dopamine extracellulaire dans le noyau accumbens core ont été déterminés à des heures différentes des heures habituelles d'injection. Deux microdialysats de 30 minutes ont été prélevés après un jour de sevrage (a) et après 14 jours de sevrage (b). Chaque colonne représente les taux de dopamine extracellulaires en ng/ml (moyenne \pm SEM). * $p<0.05$ Test t de Student, ($n=6-10$).

3. Densité des récepteurs dopaminergiques D1-like et D2-like dans les structures mésolimbiques et nigro-striées

a. Récepteurs dopaminergiques D1-like.

L'analyse de la variation des récepteurs D1-like dans les structures des voies dopaminergiques centrales a révélé de nombreuses variations (Figure 27).

Le profil intermittent a induit des modifications des récepteurs D1-like uniquement après 14 jours de sevrage (figures 27a et 27b). Une diminution de ces récepteurs dans la voie nigro-striée a été observée (Figure 27b. substance noire : $t_{(82)}=2.59$, $p<0.05$; caude putamen : $t_{(108)}=2.0$, $p<0.05$) alors qu'aucune variation n'a été observée dans la voie mésolimbique (Figure 27b. aire tegmentale ventrale : $t_{(91)}=1.62$, $p=0.11$; noyau accumbens : $t_{(106)}=1.78$, $p=0.07$). Après un jour de sevrage, le profil intermittent n'a pas induit de modifications des récepteurs D1-like dans les différentes structures analysées (Figure 27a. substance noire : $t_{(56)}=0.94$, $p=0.35$; caude putamen : $t_{(84)}=1.26$, $p=0.21$; aire tegmentale ventrale : $t_{(56)}=1.17$, $p=0.09$; noyau accumbens : $t_{(69)}=0.42$, $p=0.68$).

Pour le profil Binge, contrairement au profil intermittent, des adaptations des D1-like ont été observées dès un jour de sevrage. Une forte augmentation a été mise en évidence au niveau des corps cellulaires de la voie nigrostriée dans la substance noire (Figure 27c. $t_{(60)}=3.49$, $p<0.001$) mais pas au niveau des corps cellulaires de la voie mésolimbique dans l'aire tegmentale ventrale (Figure 27c. $t_{(57)}=0.29$, $p=0.82$). Une forte diminution a été observée dans les structures contenant les terminaisons axonales des deux voies dopaminergiques, dans le caude putamen (Figure 27c. $t_{(70)}=5.24$, $p<0.0001$) et dans le noyau accumbens (Figure 27c. $t_{(49)}=4.25$, $p<0.0001$). Après 14 jours de sevrage, les récepteurs D1-like sont diminués dans l'ensemble des structures analysées (Figure 27d. substance noire : $t_{(69)}=2.11$, $p<0.05$; caude putamen : $t_{(98)}=5.71$, $p<0.0001$; aire tegmentale ventrale : $t_{(61)}=3.77$, $p<0.001$; noyau accumbens : $t_{(97)}=8.75$, $p<0.0001$).

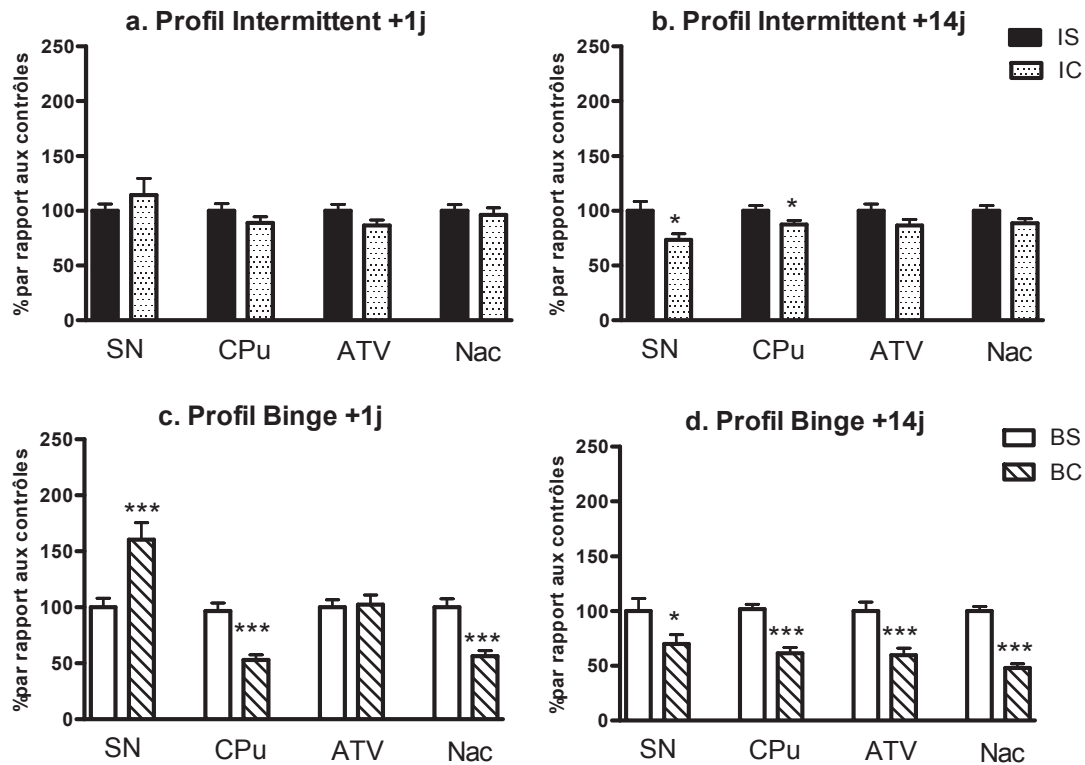


Figure 27. Densité des récepteurs D1-like en conséquence à nos deux profils d'administration.

La densité des récepteurs D1-like a été quantifiée par autoradiographie *in situ* après 1 jour et 14 jours de sevrage. Chaque colonne représente la densité de récepteurs par structure en pourcentage par rapport aux contrôles (moyenne \pm SEM). L'analyse statistique a été faite par comparaison des moyennes avec le Test *t* de Student ($n=58-110$). * $p<0.05$, *** $p<0.001$. I: intermittent; B: binge; IS: intermittent saline; IC: intermittent cocaine; BS: binge saline; BC: binge cocaine.

b. Récepteurs dopaminergiques D2-like.

Les récepteurs dopaminergiques D2-like ont également été fortement modifiés par les deux types de traitements à la cocaïne (Figure 28.).

Une diminution de la densité des récepteurs D2-like s'est mise en place au niveau des structures contenant les corps cellulaires dopaminergiques, dans la substance noire (Figure 28a. $t_{(91)}=7.36$, $p<0.0001$) et dans l'aire tegmentale ventrale (Figure 28a. $t_{(94)}=50.62$, $p<0.0001$), tandis qu'une augmentation a été observée dans les structures contenant les terminaisons dopaminergiques, dans le caude putamen (Figure 28a. $t_{(71)}=5.65$, $p<0.0001$) et dans le noyau accumbens (Figure 28a. $t_{(64)}=9.33$, $p<0.0001$). Après 14 jours de sevrage, cette opposition de variation entre les corps cellulaires et les terminaisons dopaminergiques n'est plus observée. La densité des D2-like est rétablie dans la substance noire (Figure 28b. $t_{(78)}=0.68$, $p=0.49$) et la densité dans les autres structures analysées est diminuée (Figure 28b. caude putamen : $t_{(104)}=4.51$, $p<0.0001$, aire tegmentale ventrale : $t_{(80)}=2.17$, $p<0.05$, noyau accumbens : $t_{(88)}=2.77$, $p<0.01$).

Le profil d'administration binge a également provoqué des modifications de la densité des D2-like dès un jour de sevrage. Dans la voie nigro-striée, une diminution des D2-like dans le caude putamen a été observée (Figure 28c. $t_{(74)}=4.49$, $p<0.0001$) tandis qu'aucune modification n'a été observée dans la substance noire (Figure 28c. $t_{(82)}=0.62$, $p=0.54$). Dans la voie mésolimbique, une augmentation de ces récepteurs a été mise en évidence au niveau des corps cellulaires dans l'aire tegmentale ventrale (Figure 28c. $t_{(84)}=2.31$, $p<0.05$) accompagnée d'une diminution au niveau des terminaisons dopaminergiques dans le noyau accumbens (Figure 28c. $t_{(66)}=4.57$, $p<0.0001$). Après 14 jours de sevrage, il n'y a pas eu de modification dans la substance noire (Figure 28d. test *t* de Student, $t_{(80)}=0.77$, $p=0.44$) et la densité dans le noyau accumbens revient à la normale (Figure 28d. $t_{(87)}=0.82$, $p=0.41$). La diminution dans le caude putamen persiste (Figure 28d. $t_{(109)}=1.99$, $p<0.05$) et l'augmentation observée après un jour de sevrage dans l'aire tegmentale ventrale, devient une diminution (Figure 28d. $t_{(78)}=3.02$, $p<0.01$).

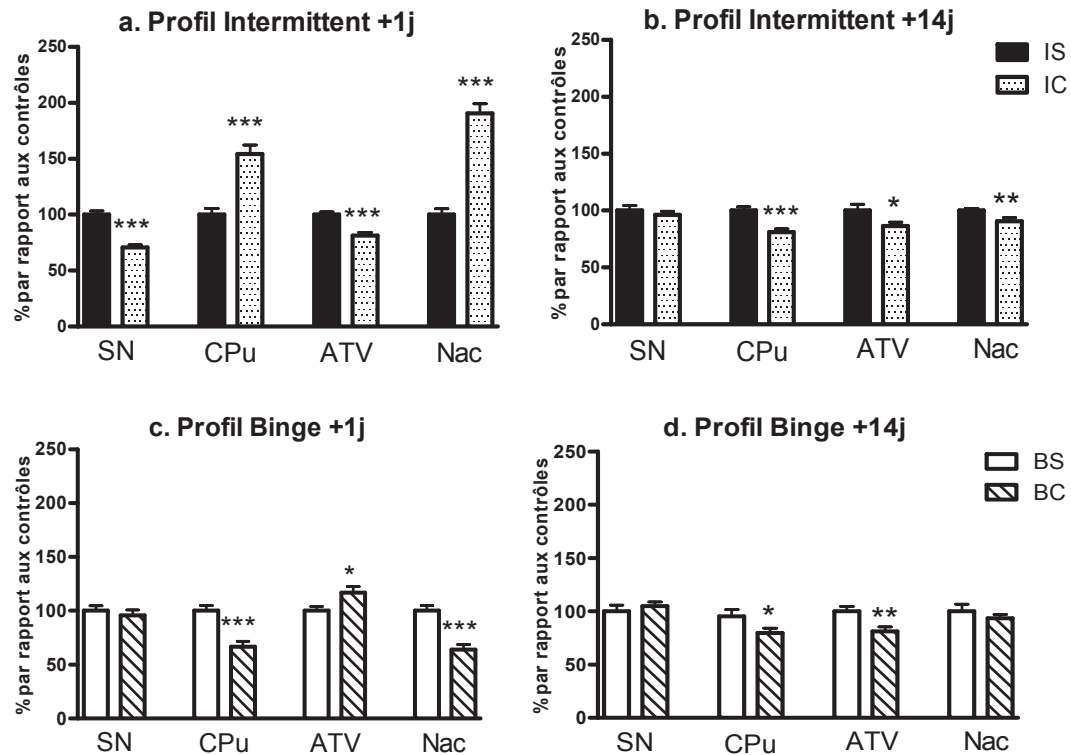


Figure 28. Densité des récepteurs D2-like, en conséquence à deux profils d'administration.

La densité des récepteurs D2-like a été quantifiée par autoradiographie *in situ* après 1 jour et 14 jours de sevrage. Chaque colonne représente la densité de récepteurs par structure en pourcentage par rapport aux contrôles (moyenne \pm SEM). L'analyse statistique a été faite par comparaison des moyennes avec le Test *t* de Student ($n=66-111$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. I: intermittent; B: binge; IS: intermittent saline; IC: intermittent cocaine; BS: binge saline; BC: binge cocaine.

Objectif 2 : Etude de l'anticipation de l'effet renforçant de la cocaïne, sans présentation d'indices de rappel.

Le but de ce travail a été d'étudier l'implication de la dopamine dans l'anticipation de l'effet renforçant de la cocaïne, observée au niveau comportemental exactement à l'heure habituelle d'injection.

Nous avons analysé les taux de dopamine extracellulaire, prélevés exactement à l'heure d'injection dans le noyau accumbens core, par rapport aux taux de base prélevés à des heures différentes des heures d'injection. Ces prélèvements ont été réalisés sans présentation d'indices de rappel ni réinjection de cocaïne, après un sevrage court (+1 jour) et un sevrage long (+14 jours).

1. L'anticipation locomotrice

La mesure de l'activité locomotrice spontanée pendant 24h, sans intervention de l'expérimentateur a mis en évidence des différences de régulations de l'activité comportementale spontanée exactement à l'heure habituelle d'injection de la cocaïne (Figure 29).

L'analyse par ANOVA a deux facteurs a révélé une interaction significative (traitement x temps) pour le profil intermittent après 1 jour de sevrage ($F_{(1,20)}=2.36$, $p<0.001$) (Figure 29a), avec un effet du temps significatif ($F_{(1,20)}=5.39$, $p<0.0001$), mais pas d'effet du traitement ($F_{(1,20)}=1.39$, N.S.). L'analyse post-hoc a montré une augmentation de la locomotion pour le groupe IC par rapport au groupe IS pendant la 24^{ème} et la 25^{ème} heure après la dernière injection, coïncidant avec l'heure à laquelle les rats ont eu l'habitude de recevoir de la cocaïne pendant la durée des traitements.

Cet effet ne persiste pas après 14 jours de sevrage (Figure 29b) car nous n'avons pas mis en évidence d'interaction (traitement x temps $F_{(1,19)}=1.05$, N.S.).

Contrairement aux intermittents, la locomotion pendant 24h des animaux du groupe binge après 1 jour et 14 jours de sevrage n'était pas différente de leurs contrôles saline (Figure 29c and 29d). Pourtant, une interaction significative entre le temps et le traitement a été observée. Celle-ci est principalement due à une activité locomotrice supérieure pendant la première heure de mesure, pour les animaux prétraités à la cocaïne par rapport aux saline (+ 1jour, Figure 29c: interaction traitement x temps : $F_{(1,25)}=2.15$, $p<0.01$, effet traitement : $F_{(1, 25)}=0.14$, N.S. et effet temps : $F_{(1, 25)}=4.31$, $p<0.0001$; + 14 jours Figure 29d: interaction traitement x temps : $F_{(1,21)}=2.26$, $p<0.001$, effet traitement : $F_{(1, 21)}=0.36$, N.S., et effet temps : $F_{(1,21)}=4.21$, $p<0.0001$).

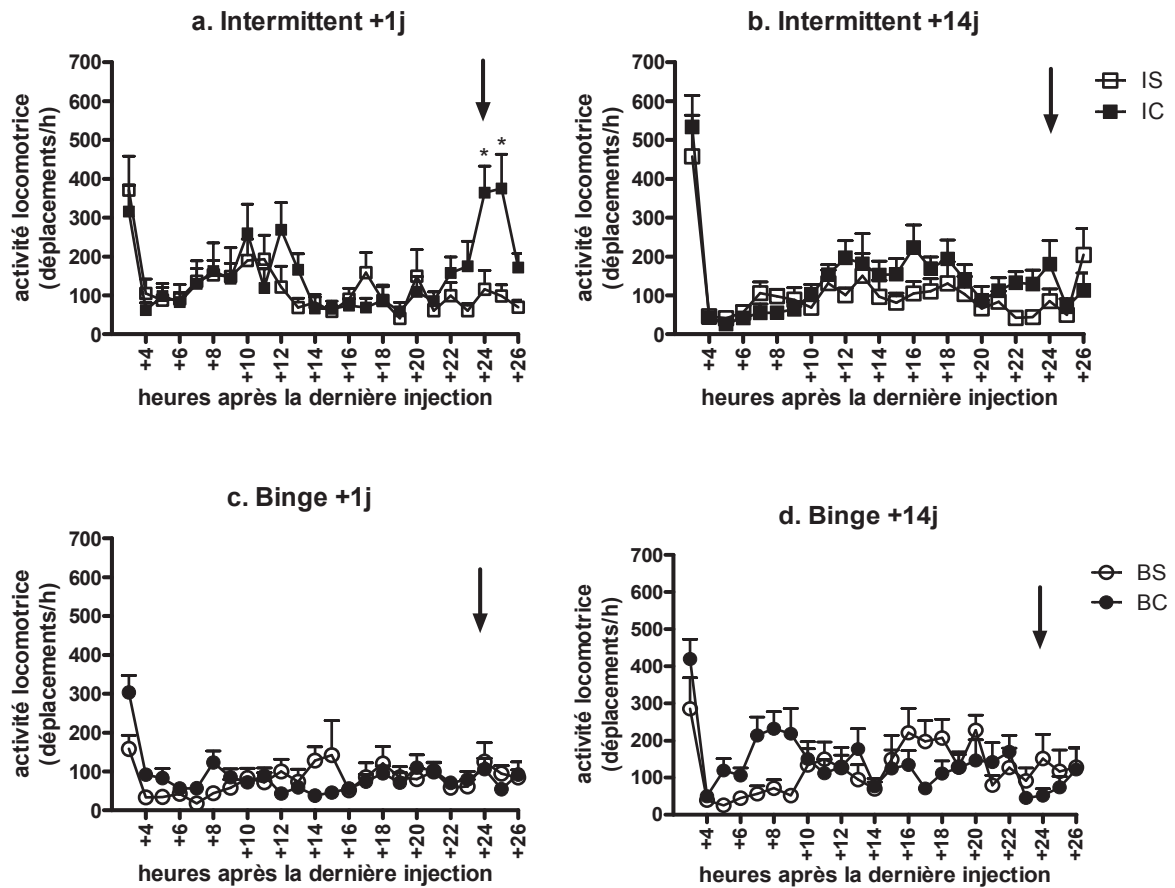


Figure 29. Anticipation comportementale.

L'activité locomotrice a été mesurée pendant 24h, après 1 jour (a et c) et 14 jours de sevrage (b et d). Les animaux ont été placés dans l'actimètre 2 heures après la dernière injection des traitements. Les flèches indiquent les heures habituelles d'injection de cocaïne réalisées au cours des traitements. Les résultats sont exprimés en déplacements par heure (moyenne \pm SEM). * $p < 0.05$, ANOVA à deux facteurs et test post-hoc de Bonferroni, ($n = 9$ to 14). I: intermittent; B: binge; IS: intermittent saline; IC: intermittent cocaine; BS: binge saline; BC: binge cocaine.

2. L'anticipation neurochimique.

La figure 30a révèle par le test *t* de Student, une augmentation significative de la dopamine extracellulaire dans le core du noyau accumbens, exactement à l'heure habituelle d'injection pour les deux profils d'administration, après un jour de sevrage (IC $n=20$, $t_{(18)}=3.81$, $p<0.01$ et BC $n=12$, $t_{(10)}=2.36$, $p<0.01$). Il est intéressant de noter que cet effet persiste après 14 jours de sevrage, uniquement pour le groupe intermittent ($n=15$, $t_{(13)}=2.86$, $p<0.05$) (Figure 30b).

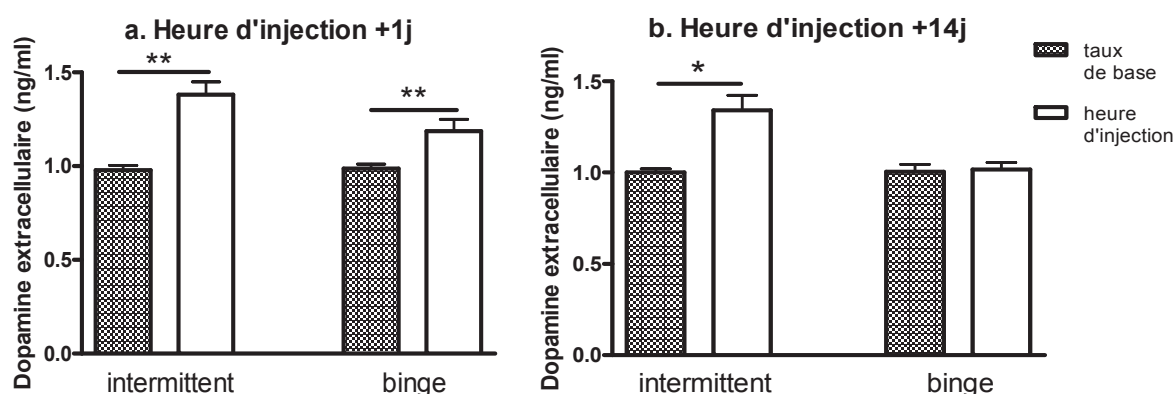


Figure 30. Dopamine extracellulaire dans le core du noyau accumbens, à l'heure habituelle d'injection.

Les taux de base ont été déterminés par prélèvement de deux microdialysats de 30 minutes après 1 jour (a) et 14 jours de sevrage (b). Les taux de dopamine extracellulaire à l'heure d'injection ont été déterminés par prélèvement de deux microdialysats de 30 minutes exactement à l'heure à laquelle les animaux ont eu l'habitude de recevoir la cocaïne pendant les traitements. Les prélèvements ont été réalisés sans injection préalable de cocaïne et sans présentation d'indices de rappel. Chaque colonne représente les taux de dopamine extracellulaire en ng/ml (moyenne \pm SEM). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, test *t* de student, ($n=6-14$).

Objectif 3 : Etude de l'effet d'une dose de rappel de cocaïne.

Le but de ce travail a été d'étudier la réponse comportementale et neurochimique suite à l'injection d'une dose de rappel de cocaïne chez des animaux ayant été traités selon les deux profils d'administration de cocaïne.

Nous avons étudié la réponse locomotrice et la réponse exploratoire dans un nouvel environnement ainsi que la réponse dopaminergique extracellulaire dans le noyau accumbens core après un sevrage court (+1 jour) et un sevrage long (+14 jours).

1. Analyse de la réponse comportementale à une dose de rappel de cocaïne.

a. L'activité locomotrice.

La réponse locomotrice mesurée pendant une heure, immédiatement après l'injection d'une dose de rappel de cocaïne ou de saline, n'a pas été modifiée chez le groupe intermittent (Figure 31) par rapport à leur contrôle, après 1 jour ou 14 jours de sevrage. En revanche, nous avons observé que l'injection de cocaïne entraîne une augmentation de la locomotion plus importante que l'injection de sérum physiologique chez les animaux traités selon le profil intermittent avec du sérum physiologique ou de la cocaïne (ANOVA un facteur : +1 jour, Figure 31a: intermittent: $F_{(3, 43)}=20.67$, $p<0.0001$; + 14 jours, Figure 31b, $F_{(3, 44)}=23.50$, $p<0.0001$).

Pour le groupe binge, la figure 31c met en évidence une sensibilisation significative à l'effet hyper locomoteur de la cocaïne après un jour de sevrage ($F_{(3, 41)}=40.89$, $p<0.0001$; Bonferroni BS rappel cocaïne vs. BC rappel cocaïne $p<0.01$). Après 14 jours de sevrage l'activité locomotrice n'est plus modifiée par rapport au groupe contrôle qui a reçu également un rappel de cocaïne. Comme pour le profil intermittent, la réponse des animaux binge (cocaïne ou saline) injectés avec une dose de rappel de cocaïne est supérieure à celle des animaux injectés avec une dose de rappel de sérum physiologique (ANOVA un facteur $F_{(3, 40)}=20.21$, $p<0.0001$). La réponse locomotrice après les injections de rappel de cocaïne n'est pas différente entre les prétraités cocaïne et les prétraités saline.

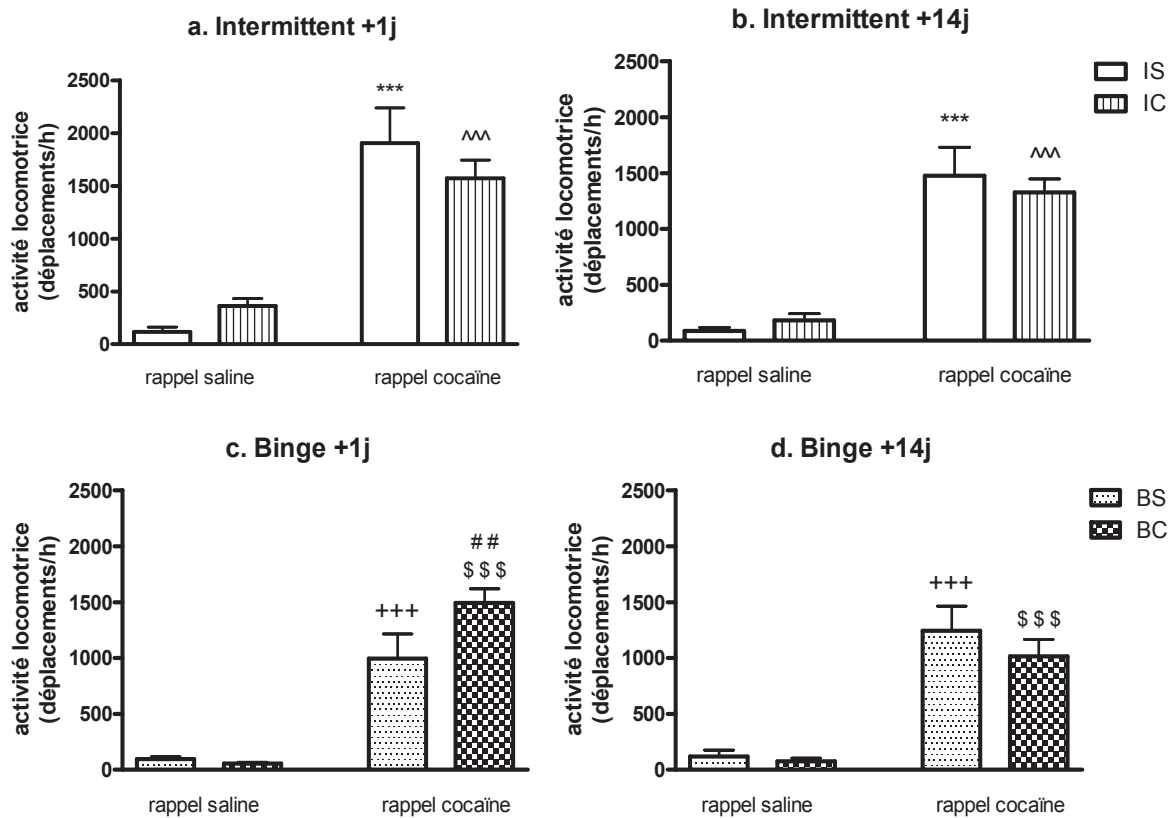


Figure 31. Réponse locomotrice à l'injection d'une dose de rappel de cocaïne.

Les animaux ont reçu une injection de rappel de cocaïne après 1 jour (a et c) et 14 jours (b et d) de sevrage, à des heures différentes des heures habituelles d'injection. L'activité locomotrice a été enregistrée pendant une heure et elle a été exprimée en déplacement par heure (moyenne \pm SEM). *** $p < 0.0001$, IS rappel saline vs. IS rappel cocaïne. ^^ $p < 0.001$ IC rappel saline vs. IC rappel cocaïne. +++ $p < 0.0001$ BS rappel saline vs. BS rappel cocaïne. \$\$\$ $p < 0.0001$ BC rappel saline vs. BC rappel cocaïne. ## $p < 0.05$ BS rappel cocaïne vs. BC rappel cocaïne ; ANOVA à un facteur, ($n = 9-14$). I: intermittent; B: binge; IS: intermittent saline; IC: intermittent cocaïne; BS: binge saline; BC: binge cocaïne.

b. L'activité exploratoire.

i. Réponse exploratoire des animaux intermittents.

L'injection d'une dose de saline pour mesurer l'activité exploratoire spontanée des IC dans un environnement nouveau n'est pas différente de celle des IS, lors de l'exposition à un nouvel environnement, immédiatement ou 30 minutes après l'injection, après 1 jour ou 14 jours de sevrage (Tableau 12).

L'injection de cocaïne chez les rats naïfs IS, a entraîné une augmentation de l'activité comportementale. Cependant les animaux traités selon le profil intermittent avec de la cocaïne ont développé une réponse exploratoire différente de celle des animaux saline.

Après un jour de sevrage, le nombre de carreaux traversés (locomotion horizontale) est inférieur pour les animaux prétraités à la cocaïne par rapport aux animaux prétraités à la saline, immédiatement ($F_{(3,57)}=36.07$, $p<0.0001$) et lors du second test, 30 minutes ($F_{(3,57)}=14.04$, $p<0.0001$) après l'injection d'une dose de rappel de cocaïne. Ceci est également observé pour le nombre de redressements (activité verticale) immédiatement ($F_{(3,55)}=5.61$, $p<0.01$) et lors du second test, 30 minutes ($F_{(3,57)}=11.13$, $p<0.0001$) après l'injection d'une dose de rappel de cocaïne.

Après 14 jours de sevrage, cet effet ne persiste que pour l'activité verticale, lors du second test, 30 minutes après l'injection de cocaïne (activité verticale, $F(3,43)=16.70$, $p<0.0001$) mais pas immédiatement après l'injection de rappel ($F_{(3,46)}=5.11$, $p<0.01$). De même, la réponse de l'activité horizontale après l'injection de rappel de cocaïne, n'est plus différente entre IC et IS après 14 jours de sevrage (immédiatement : $F_{(3,33)}=13.77$, $p<0.0001$ et lors du second test 30 minutes plus tard ($F_{(3,42)}=18.71$, $p<0.0001$).

Tableau 12. Réponse exploratoire du groupe intermittent, à une injection de rappel de saline ou de cocaïne.

Intermittents		Réponse à un rappel de saline		Réponse à un rappel de cocaïne	
Moment d'analyse après l'injection de rappel		immédiatement	+ 30 minutes	immédiatement	+ 30 minutes
+1 jour	Activité horizontale	=	=	↓↓↓	↓↓
	Activité verticale	=	=	↓↓	↓↓↓
+14 jours	Activité horizontale	=	=	=	=
	Activité verticale	=	=	=	↓

Le comportement des rats traités selon le profil intermittent a été observé après 1 jour et 14 jours de sevrage dans un environnement nouveau après l'administration d'une dose de rappel de saline ou de cocaïne. Deux tests d'open field d'une durée de 6 minutes ont été réalisés, le premier immédiatement après les injections et le deuxième, 30 minutes plus tard. L'activité exploratoire dans le nouvel environnement a été comptabilisée par la mesure de l'activité locomotrice horizontale (nombre de carreaux traversés), et de l'activité locomotrice verticale (nombre de redressements). Les variations sont exprimées par rapport à la réponse des animaux contrôles IS. L'analyse statistique des résultats sevrage a été faite par analyse de variance (ANOVA) à un facteur et un test de Bonferroni, comparant chaque type d'activité par temps de sevrage. (n= 10 - 16). $p < 0.05$ a été choisi comme seuil de significativité. ↓ Réponse inférieure à celle des saline, = réponse identique à celle des saline, ↓ $p < 0.05$, ↓↓ $p < 0.01$, ↓↓↓ $p < 0.001$.

ii. Réponse exploratoire des animaux binge.

Comme pour le groupe intermittent, l'injection d'une dose de saline pour mesurer l'activité exploratoire spontanée des animaux binge dans un environnement nouveau n'est pas différente de celle des animaux prétraités à la saline, lors des open fields réalisés immédiatement ou 30 minutes après l'injection, après 1 jour ou 14 jours de sevrage (Tableau 13). L'injection de cocaïne chez les rats naïfs du profil binge, entraîne, comme pour les rats naïfs du profil intermittent, une augmentation de l'activité comportementale après un jour et après 14 jours de sevrage.

La comparaison de la réponse comportementale dans un nouvel environnement, entre les animaux binge saline et les animaux binge cocaïne après une injection de rappel de cocaïne a mis en évidence des adaptations différentes.

Après un jour de sevrage, immédiatement après l'injection de rappel de cocaïne, l'augmentation du nombre de carreaux traversés ($F_{(3,47)}=20.04$, $p<0.0001$) et du nombre de redressements ($F_{(3,47)}=5.97$, $p<0.01$) est similaire aux contrôles. Cependant, lors du deuxième open field, 30 minutes plus tard, le nombre de carreaux traversés est significativement supérieur chez les animaux prétraités à la cocaïne par rapport à ceux prétraités à la saline, injectés avec une dose de rappel de cocaïne ($F_{(3,47)}=24.21$, $p<0.0001$), ce qui n'est pas observé pour le nombre de redressements qui restent similaires aux contrôles ($F_{(3,47)}=19.77$, $p<0.0001$).

Après 14 jours de sevrage, l'augmentation de l'activité horizontale après une dose de cocaïne est inférieure chez les animaux binge par rapport à leur contrôle, immédiatement ($F_{(3,31)}=13.09$, $p<0.0001$) mais pas 30 minutes après l'injection ($F_{(3,31)}=10.61$, $p<0.0001$). L'augmentation de l'activité verticale est également inférieure par rapport aux contrôles, immédiatement ($F_{(3,31)}=14.09$, $p<0.0001$) et lors du second test 30 minutes après l'injection de cocaïne ($F_{(3,30)}=6.59$, $p<0.01$).

Tableau 13. Réponse exploratoire du groupe binge, à une injection de rappel de saline ou de cocaïne par rapport aux contrôles.

Binge		Réponse à un rappel de saline		Réponse à un rappel de cocaïne	
Moment d'analyse après l'injection de rappel		immédiatement	+ 30 minutes	immédiatement	+ 30 minutes
+1 jour	Activité horizontale	=	=	=	↑
	Activité verticale	=	=	=	=
+14 jours	Activité horizontale	=	=	↓	=
	Activité verticale	=	=	↓↓	↓

Le comportement des rats traités selon le profil binge a été observé après 1 jour et 14 jours de sevrage dans un environnement nouveau après l'administration d'une dose de rappel de saline ou de cocaïne. Deux tests d'open field d'une durée de 6 minutes ont été réalisés, le premier immédiatement après les injections et le deuxième, 30 minutes plus tard. L'activité exploratoire dans le nouvel environnement a été comptabilisée par la mesure de l'activité locomotrice horizontale (nombre de carreaux traversés), et de l'activité locomotrice verticale (nombre de redressements). Les variations sont exprimées par rapport à la réponse des animaux contrôles BS. L'analyse statistique des résultats a été faite par analyse de variance (ANOVA) à un facteur et un test de Bonferroni, comparant chaque type d'activité par temps de sevrage (n= 7 - 13). $p < 0.05$ a été choisi comme seuil de significativité. ↓ Réponse inférieure à celle des saline, ↑ Réponse supérieure à celle des saline, = réponse identique à celle des saline, ↑ ou ↓ $p < 0.05$, ↓↓ $p < 0.01$, ↓↓↓ $p < 0.001$.

c. Les stéréotypies

La mesure des stéréotypies au cours des open fields, a mis en évidence que ce comportement n'est visible que lorsque les animaux sont testés sous l'effet d'une dose de rappel de cocaïne. Aucune stéréotypie n'est visible après l'injection d'une dose de rappel de saline quel que soit le profil d'administration.

Les animaux prétraités avec de la saline et naïfs pour la cocaïne, ont développé des stéréotypies après une injection de cocaïne, observées uniquement lors du second open field réalisé 30 minutes après l'injection (données non présentées). Les animaux prétraités avec de la cocaïne, ont exprimé des stéréotypies immédiatement après l'injection mais aussi 30 minutes après l'injection (Figure 32).

L'analyse du nombre de stéréotypies développées par chaque profil d'administration après une dose de rappel de cocaïne a mis en évidence une interaction (traitement x temps), après un jour de sevrage (figure 32a, $F_{(3,48)}=4.83$, $p<0.05$), accompagnée d'un effet du traitement ($F_{(3,48)}=11.42$, $p<0.01$) et d'un effet du temps ($F_{(3,48)}=16.05$, $p<0.001$). Le groupe intermittent cocaïne a une augmentation significative et importante du nombre de stéréotypies lors du second open field par rapport à celui réalisé immédiatement après la dose de rappel de cocaïne. De plus, cette augmentation est significativement supérieure au nombre de stéréotypies exprimées par les animaux binge.

Après 14 jours de sevrage, le nombre de stéréotypies exprimées par les deux profils d'administration ne sont plus différentes (Figure 32b, $F_{(3,48)}=0.72$, $p=0.40$).

Nous avons également comparé le nombre de stéréotypies exprimées par les animaux prétraités à la cocaïne par rapport aux contrôles saline injectés avec une dose de cocaïne pour la première fois (données non présentées). Pour le profil intermittent, l'administration d'une dose de cocaïne après un jour de sevrage, entraîne une augmentation du nombre de stéréotypies exprimées par les animaux prétraités à la cocaïne par rapport aux contrôles injectés à la cocaïne pour la première fois. Ceci est observé immédiatement après l'injection de cocaïne (ANOVA à un facteur : $F_{(3,52)}=8.07$, $p<0.001$. test post-hoc de Bonferroni : ISc vs. ICc : $p<0.01$) et 30 minutes après (ANOVA à un facteur : $F_{(3,53)}=22.26$, $p<0.0001$. test post-hoc de Bonferroni : ISc vs. ICc : $p<0.001$). Après 14 jours de sevrage cela est toujours observé 30 minutes après l'injection ($F_{(3,38)}=9.92$, $p<0.0001$. test post-hoc de Bonferroni : ISc vs. ICc : $p<0.01$) mais pas immédiatement après l'injection ($F_{(3,42)}=3.56$, $p<0.05$. test post-hoc de Bonferroni : ISc vs. ICc : n.s.). Pour les animaux prétraités avec le profil binge, l'injection de cocaïne n'a pas entraîné de différence du nombre de stéréotypies par rapport à leurs contrôles après un jour de sevrage (immédiatement : $F_{(3,43)}=2.09$, n.s. et après 30 minutes : $F_{(3,43)}=3.25$, $p<0.05$. test post-hoc de Bonferroni : BSc vs. BCc : n.s.). Après 14 jours de sevrage le nombre de stéréotypies est supérieure pour les animaux du groupe binge cocaïne par rapport à leurs

contrôles lorsque la mesure est faite immédiatement après l'injection de rappel de cocaïne ($F_{(3,27)}=11.17$, $p<0.001$. test post-hoc de Bonferroni : BSc vs. BCc : $p<0.001$) mais pas 30 minutes plus tard ($F_{(3,27)}=6.44$, $p<0.001$. test post-hoc de Bonferroni : BSc vs. BCc n.s.).

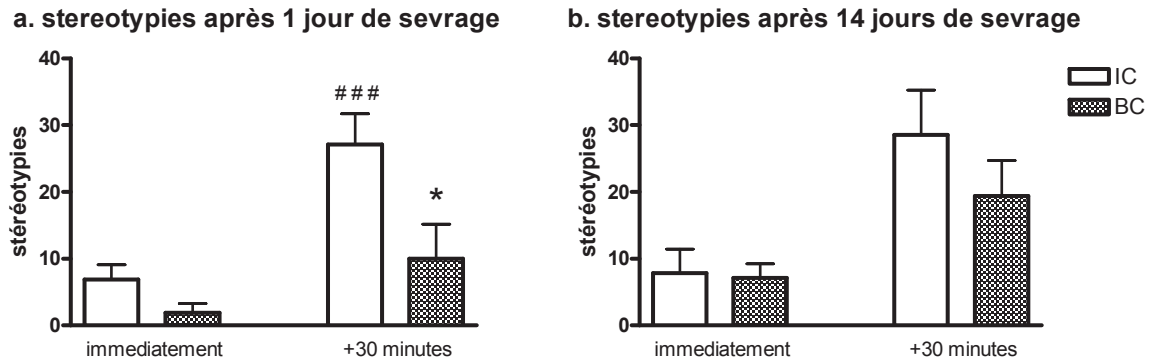


Figure 32. Expression de stéréotypies en réponse à une dose de rappel de cocaïne.

Le nombre de stéréotypies réalisées par les animaux à la suite de l'injection d'une dose de rappel de cocaïne ont été comptabilisées immédiatement et 30 minutes après l'injection, pendant 6 minutes dans un open field. ANOVA à deux facteurs ($n=7-16$). Le seuil de significativité choisi est de $p<0.05$. Des analyses post-hoc ont été réalisées avec le test de Bonferroni. I : Intermittent, B : Binge, IC : Intermittent Cocaïne, BC : Binge Cocaïne. ### $p<0.001$, # $p<0.05$: IC (immédiatement) vs. IC (+30minutes); * $p<0.05$ IC (+30minutes) vs. BC (+30minutes).

2. Analyse de la réponse neurochimique dopaminergique à une dose de rappel de cocaïne.

L'administration d'une dose de rappel de cocaïne après un jour de sevrage a induit une augmentation de dopamine extracellulaire chez les IC et les IS par rapport aux animaux ayant reçu une injection de rappel de saline (Figure 33, ANOVA à deux facteurs, interaction traitement x microdialysat : $F_{(3, 21)}=3.03$, $p<0.01$, effet traitement : $F_{(3, 21)}=4.72$, $p<0.05$, effet temps: $F_{(3, 21)}=11.76$, $p<0.0001$,) (Figure 33a). Des résultats similaires ont été observés après 14 jours de sevrage (interaction traitement x microdialysat : $F_{(3, 20)} = 2.84$, $p<0.01$, effet traitement : $F_{(3, 20)}= 3.39$, $p<0.05$, effet temps : $F_{(3,20)}=8.76$, $p<0.0001$) (Figure 33b).

Pour le profil binge, après 1 jour de sevrage, l'ANOVA à deux facteurs a mis en évidence une interaction significative ($F_{(3, 24)} =2.37$, $p<0.05$), un effet du traitement ($F_{(3, 24)}=3.66$, $p<0.05$) et un effet du temps ($F_{(3, 24)}=8.76$, $p<0.0001$). L'analyse post-hoc a révélé (Figure 33c) une augmentation plus importante de la dopamine extracellulaire après une injection de cocaïne pour le groupe BC (+164% \pm 53.83 des taux de base), par rapport au groupe contrôle qui a reçu la cocaïne pour la première fois (+72% \pm 46.87 des taux de base). La Figure 33d montre que la sensibilisation neurochimique n'est plus observée après 14 jours de sevrage (ANOVA à deux facteurs : interaction traitement x microdialysat : $F_{(3, 24)}=2.29$, $p<0.05$, effet du traitement : $F_{(3, 24)}=5.39$, $p<0.01$, effet du temps : $F_{(3, 24)}=8.28$, $p<0.001$).

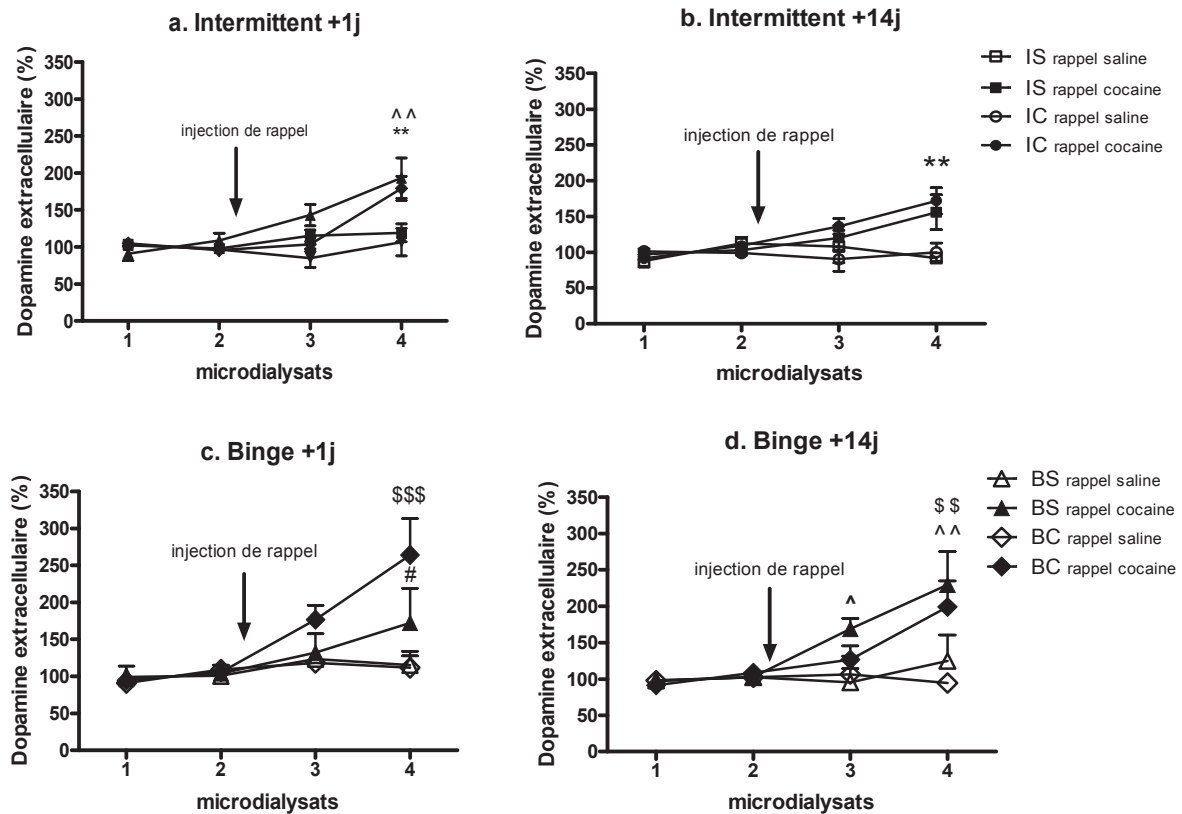


Figure 33. Dopamine extracellulaire dans le noyau accumbens core en réponse à une dose de rappel de cocaïne.

Les microdialysats ont été prélevés toutes les 30 minutes en dehors des heures habituelles d'injection de cocaïne. Les taux de base de dopamine dans le core du noyau accumbens qui ont été mesurés avant l'injection de la dose de rappel de cocaïne, sont (ng/ml) : après 1 jour de sevrage, IS: 1.135 ± 0.144 , $n=9$, IC: 0.979 ± 0.060 , $n=14$, BS: 1.129 ± 0.138 , $n=11$, BC: 0.987 ± 0.069 , $n=11$ et après 14 jours de sevrage, IS: 1.259 ± 0.217 , $n=10$, IC: 1.001 ± 0.041 , $n=10$, BS: 1.032 ± 0.076 , $n=12$, BC: 1.005 ± 0.098 , $n=12$. Les résultats sont exprimés en pourcentage (moyenne \pm SEM) des taux de base. La flèche noire indique le moment où l'injection de rappel a été réalisée. ** $p < 0.01$ IS rappel saline vs. IS rappel cocaïne. ^^ $p < 0.01$, ^^ $p < 0.001$ IC rappel saline vs. IC rappel cocaïne. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ BS rappel saline vs. BS rappel cocaïne. \$\$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.001$ BC rappel saline vs. BC rappel cocaïne. # $p < 0.05$ BS rappel cocaïne vs. BC rappel cocaïne ; ANOVA à deux facteurs, test post-hoc de Bonferroni ($n=4-7$). IS: intermittent saline; IC: intermittent cocaïne; BS: binge saline; BC: binge cocaïne.

DISCUSSION – PREMIERE PARTIE



Discussion des résultats.

Notre étude montre que l'administration d'une même molécule, la cocaïne, selon deux profils d'administration différents, choisis pour être fréquemment utilisés dans la littérature, induit des modifications différentes au niveau comportemental, neurochimique et cellulaire qui sont liées à des modifications neurobiologiques spécifiques.

1. Les modifications induites par l'administration répétée de cocaïne selon nos deux profils d'administration.

Nous avons tout d'abord étudié les conséquences de nos deux profils d'administration de cocaïne sur les taux de base de dopamine extracellulaire dans le noyau accumbens core et sur l'activité comportementale basale spontanée.

Dans le noyau accumbens core, les adaptations à long terme sont différentes selon le profil d'administration de cocaïne. Pour les animaux traités selon le profil intermittent, les taux de base de dopamine extracellulaire sont diminués, après un jour de sevrage. Cette diminution persiste après 14 jours de sevrage. En revanche, pour les animaux traités selon le profil binge, bien que les taux de base de dopamine extracellulaire soient également diminués après un jour de sevrage, cette diminution n'est plus observée après 14 jours de sevrage (Tableau 14).

La diminution des taux de base de dopamine extracellulaire est observée pour les deux traitements, ce qui semble indiquer une adaptation commune des conséquences d'une prise répétée de cocaïne, après un sevrage court. Dans la littérature, les études portant sur les conséquences d'une administration répétée de cocaïne sur les taux de dopamine extracellulaire ont rapporté des résultats divergents. Certaines études ont rapporté une diminution des taux de dopamine extracellulaire avec des traitements impliquant plusieurs injections par jour (Rosetti et al, 1992a et 1992b, Imperato et al, 1992b, Maisonneuve et al, 1995) ou une seule injection mais avec de fortes doses (20mg/kg : Parsons et al, 1991, 30mg/kg : Robertson et al, 1991). Cette déplétion en dopamine a pu être observée dès le premier jour de sevrage dans le striatum dorsal et ventromédian (Maisonneuve et al, 1995) et dans le noyau accumbens (Duvauchelle et al, 2000a). Elle a aussi été rapportée après 3 jours (Rossetti et al, 1992 a et 1992b) et 10 jours de sevrage (Rossetti et al, 1992a, Parsons et al, 1991) mais pas après 15 jours (Rossetti et al, 1992a). D'autres études ont observé une augmentation des taux de dopamine extracellulaire après des traitements d'une durée de 3 jours (Heidbreider et Shippenberg, 1994), 5 jours (Kalivas et Duffy, 1993b) ou 10 jours (Weiss et al, 1992a, Heidbreider et al, 1996) et

après des sevrages de 1 à 3 jours (Weiss et al, 1992a, Heidbreder et Shippenberg, 1994, Heidbreder et al, 1996) mais pas 7 jours (Weiss et al, 1992a), 12 jours (Heidbreder et al, 1996) ou 15 jours (Kalivas et Duffy, 1993b). Enfin, certains auteurs ont aussi rapporté une absence de modification des taux de dopamine extracellulaire suite des administrations répétées de cocaïne par voie intrapéritonéale après 1, 2 ou 14 jours de sevrage (Segal et Kukzenski 1992, Kalivas et Duffy, 1992a) ou bien suite à des administrations intraveineuses de doses similaires de celles utilisées dans un modèle d'autoadministration (McFrand et al, 2003).

La grande diversité de résultats rapportés par la littérature montre qu'il est difficile de définir les conséquences que peut avoir la cocaïne sur les taux de base de dopamine. Toutefois, la déplétion en dopamine observée suite à nos deux profils d'administration peut être interprétée comme le résultat d'une compensation face aux stimulations importantes du système dopaminergique, causées par les prises répétées de cocaïne. Cette diminution pourrait expliquer l'état d'anhédonie et de dépression décrits lors de sevrages, car le système dopaminergique est connu pour être impliqué dans la modulation de l'humeur (Maisonneuve et al, 1995, Hatzigiakoumis et al, 2011).

De façon intéressante, nous avons observé que la diminution de la dopamine extracellulaire dans le core du noyau accumbens ne persiste que chez les rats intermittents et pas chez les rats binge après le sevrage prolongé. Nous pouvons donc penser que les effets du sevrage à long terme sont différents selon le profil d'administration de cocaïne et que des altérations différentes des mécanismes de régulation des taux de dopamine extracellulaire se sont mis en place pour chaque profil d'administration de cocaïne.

La mesure de l'activité locomotrice générale par actimétrie après un jour et 14 jours de sevrage n'a pas mis en évidence de modifications de l'activité basale. En effet, la mesure en dehors des heures d'injection ou bien suite à l'administration d'une dose de saline n'a montré aucune différence entre les animaux prétraités à la cocaïne et leurs contrôles prétraités avec du sérum physiologique. Ceci a également été observé dans des études précédentes (Kalivas et Duffy, 1993a, Heidbreder et al, 1996).

Nous avons également mis en évidence qu'aucun des deux profils d'administration de cocaïne n'induit de différence du comportement exploratoire spontané lors de l'exposition au nouvel environnement. Ce qui est en accord avec Seymour et collaborateurs (Seymour et Wagner, 2008). Cependant, une étude a pu mettre en évidence une augmentation de la locomotion suite à l'administration répétée de cocaïne (20mg/kg par jour pendant 7 jours en i.p. chez le rat) sur l'activité exploratoire spontanée basale dans un nouvel environnement après 24h, 7 jours et 21 jours de sevrage (de Oliveira Cito et al, 2012). Les différents résultats obtenus selon les laboratoires,

montrent que le protocole d'administration de cocaïne doit avoir une influence différente sur l'activité exploratoire basale, néanmoins nos observations ne semblent pas aller dans ce sens.

Nous avons également analysé les variations de la densité des récepteurs dopaminergiques suite à nos deux profils d'administration permettent de mettre en évidence des modifications très différentes en fonction du profil d'administration.

Pour les deux profils d'administration, les modifications sont nombreuses et intenses après un jour de sevrage. Nous pouvons penser que ce sont des réactions spécifiques suite à chaque type de stimulations indirectes provoquées par la cocaïne sur les récepteurs via de fortes augmentations de dopamine extracellulaire pendant 14 jours. Après un sevrage de longue durée, les adaptations sont différentes de celles observées après un sevrage court pour les deux profils d'administration et sont mises en place en l'absence du psychostimulant préalablement administré régulièrement. Il a été décrit que la dépendance se faisait selon deux phases, une phase d'initiation et une phase d'expression plus tardive. Ces deux phases sont structures dépendantes et elles mettent en jeu des régulations différentes des récepteurs (Kalivas et Stewart, 1991, Cornish et Kalivas, 2001). Les modifications après un jour de sevrage pourraient donc être associées à des processus d'initiation de la dépendance, tandis que les modifications observées après 14 jours de sevrage pourraient contribuer aux processus d'expression de la dépendance et seraient le résultat des effets prolongés du sevrage.

Il est cependant peu probable que ce soient les variations de la densité des récepteurs D1-like ou D2-like qui soient responsables des modifications des taux de dopamine extracellulaire observées pour nos deux profils d'administration. En effet, nous n'avons pas observé de variation commune entre les deux profils d'administration qui pourraient expliquer la diminution des taux de base de dopamine extracellulaire après un jour de sevrage dans le noyau accumbens. De plus, après 14 jours de sevrage, bien que les taux de dopamine extracellulaire pour les animaux binge se rétablissent, des modifications de la densité des récepteurs dopaminergiques persistent toujours dans le système mésolimbique et nigro-strié. Les nombreuses modifications de la densité des récepteurs ne doivent pas non plus avoir d'influence sur le comportement basal car il n'est pas différent de celui d'animaux naïfs. Nous pouvons penser que ce sont des compensations du système dopaminergique qui peuvent se mettre en place, afin de garder une activité comportementale basale normale.

L'ensemble des résultats obtenus pour les récepteurs et la complexité des différences d'adaptations entre nos deux profils d'administration, reflètent la grande hétérogénéité des résultats rapportés dans la littérature (Peris et al, 1990, Kleven et al, 1990, Zeigler et al, 1991, Mayfield et al, 1992, Tsukada et al, 1996, Kunko et al, 1998, Sousa et al, 1999, Unterwald et al, 1994, 2001, Stanwood et al, 2000). Nous montrons par cette étude, qu'il est important de considérer le protocole

d'administration et le temps de sevrage auquel les études sont faites. Nos résultats sont en accord avec une étude précédente, où des différences de variations de la densité des récepteurs D1-like avaient été observées, après l'administration répétée d'une même dose de cocaïne, en une, deux ou trois injections par jour chez le rat (Unterwald et al, 2001).

2. Mise en évidence d'une anticipation des effets renforçants de la cocaïne à l'heure d'injection.

Un des résultats primordiaux de cette étude, est la mise en évidence d'une anticipation des effets renforçants de la cocaïne à l'heure à laquelle les animaux ont eu l'habitude de recevoir la drogue pendant les 14 jours de traitement, sans nouvelle exposition à la drogue et sans intervention de l'expérimentateur.

Le traitement des animaux selon le profil intermittent, a entraîné après un jour de sevrage une **augmentation de la libération phasique de dopamine** dans le core du noyau accumbens, exactement à l'heure habituelle d'injection sans réexposition à la drogue, alors que les taux de base de dopamine extracellulaire sont diminués en dehors des heures d'injection. De plus, cette augmentation de dopamine extracellulaire est associée à une **augmentation concomitante de l'activité locomotrice**. Après 14 jours de sevrage, seule l'augmentation de la dopamine extracellulaire persiste exactement à l'heure habituelle d'injection et il n'y a plus d'augmentation de l'activité locomotrice.

Pour les animaux traités selon le profil binge, nous avons observé une augmentation de la dopamine extracellulaire à l'heure habituelle d'injection dans le noyau accumbens core, uniquement après un jour de sevrage. Pour ce groupe il n'y a pas eu d'augmentation de la locomotion associée à l'augmentation de dopamine.

L'ensemble de ces résultats montrent qu'un traitement à la cocaïne selon le profil intermittent induit une trace mnésique comportementale et neurochimique à l'heure habituelle d'injection de cocaïne. Ceci peut être dû à un effet de la cocaïne sur les régulations circadiennes, exactement au moment où elle est administrée. En effet il a été démontré que la prise de cocaïne interagit avec le rythme circadien et que les renforcements liés à la prise de drogue sont sous l'influence d'un rythme circadien (Abarca et al, 2002), notamment, le comportement de recherche de cocaïne (Bass et al, 2010) ou de méthamphétamine (Tataroglu et al, 2006). Comme il existe une anticipation de la prise alimentaire (Stephen et al, 2002), l'anticipation de la prise de drogue serait également induite par un oscillateur qui régulerait les rythmes de la récompense (Davidson et al, 2005) et qui serait différent

de celui de la prise alimentaire mais qui serait en interaction étroite avec celui-ci (Jansen et al, 2012). Ces oscillateurs n'ont pas encore été définis mais ils seraient indépendants de l'oscillateur principal associé aux cycles jour/nuit (le noyau suprachiasmatique, NSC). Pour justifier cela, une étude récente a pu mettre en évidence que l'injection quotidienne et régulière de cocaïne pouvait induire une rythmicité de la variation de la température et de la locomotion, concordant avec les injections de cocaïne (Jansen et al, 2012). Ces auteurs ont également observé que l'augmentation de la température et de la locomotion à l'heure d'injection persistait après l'arrêt des administrations pendant 2 à 10 jours. Cette anticipation comportementale et physiologique n'est pas perturbée par la lésion du NSC. Elle est donc régulée par un rythme circadien de la récompense aux drogues.

Nous savons que la dopamine est également sous l'influence d'un rythme circadien (Castañeda et al, 2004, Sleipness et al, 2007b). Des modifications de l'expression du rythme circadien par l'injection de cocaïne à des heures fixes et de manière répétée, ont entraîné une régulation de l'augmentation de la dopamine à l'heure habituelle d'injection.

Dans notre étude, grâce aux mesures faites à la fois aux heures d'injections et en dehors des heures d'injection (niveau de base), nous avons pu mettre en évidence une rythmicité comportementale dépendante du profil d'administration car elle est uniquement observée pour le groupe intermittent. Nous avons également observé pour la première fois une rythmicité dopaminergique pour les deux profils d'administration qui ne persiste après 14 jours de sevrage que pour le profil intermittent. Cette rythmicité comportementale et neurochimique peut refléter un comportement d'anticipation. L'implication de la dopamine dans l'anticipation de l'effet renforçant de la cocaïne est bien connue (Brown et al, 1992 a et b, Burechialo et Martin-Iverson, 1996, Weiss et al, 2000, Duvauchelle et al, 2000b, Wheeler et al, 2011), cependant, cela était toujours étudié lors de la présentation d'un indice ou un contexte de rappel, voir même par l'injection d'une faible dose de cocaïne. La particularité de notre observation réside dans le fait que l'anticipation dopaminergique a été observée après l'arrêt du traitement, sans intervention de l'expérimentateur et sans présentation d'indices de rappel.

D'après nos résultats, seul le groupe intermittent a développé à la fois une anticipation neurochimique et comportementale après un jour de sevrage et seule l'anticipation neurochimique persiste après 14 jours de sevrage. La dopamine étant impliquée dans la régulation de l'activité locomotrice (Uhl et al, 2002), il est possible que l'augmentation de dopamine au moment de l'anticipation, soit responsable de l'augmentation de l'activité locomotrice pour le profil intermittent. Nous avons observé pour ce profil d'administration, une diminution importante des récepteurs D2-like après un jour de sevrage, au niveau des corps cellulaires dopaminergiques (substance noire et aire tegmentale ventrale) et une augmentation au niveau des terminaisons neuronales (caudate putamen et noyau accumbens). Il est possible que la diminution au niveau des corps cellulaires

corresponde à une diminution des autorécepteurs qui entrainerait une augmentation de la réactivité des neurones dopaminergiques, par un défaut d'inhibition favorisant la libération de dopamine en présence d'un stimulus et notamment lors de l'anticipation de l'effet renforçant de la cocaïne à l'heure habituelle d'injection.

Pour le groupe binge, l'augmentation de dopamine extracellulaire après un jour de sevrage semble moins importante que pour le groupe intermittent. Il est possible qu'elle ne soit pas suffisante pour induire une augmentation de l'activité locomotrice. Ceci peut être relié à l'augmentation de la densité des récepteurs D2-like dans l'aire tegmentale ventrale, contenant les corps cellulaires des neurones dopaminergiques projetant vers le noyau accumbens. En effet, cela pourrait être responsable d'une régulation négative de la réactivité de ces neurones.

Ces résultats montrent que selon l'heure à laquelle la mesure des taux de dopamine extracellulaire est réalisée, les variations mesurées peuvent être différentes pour un même profil d'administration de cocaïne. Nous avons vu que des résultats différents ont été rapportés dans la littérature quant aux modifications des taux de base de dopamine extracellulaire. De plus, dans ces études, l'heure à laquelle la mesure est réalisée n'est pas toujours précisée. L'observation dans notre étude d'une augmentation de la dopamine extracellulaire, exactement à l'heure d'injection de cocaïne, par opposition avec des diminutions lors de la mesure de taux de base, montre que l'heure à laquelle les études sont menées est cruciale.

3. Les conséquences de nos deux profils d'administration répétée de cocaïne en réponse à l'injection d'une dose de rappel de cocaïne après un sevrage.

L'administration répétée de cocaïne conduit souvent au développement d'adaptations comportementales spécifiques chez le rongeur, tel que la sensibilisation. Cette modification de la régulation comportementale peut être mise en évidence par une injection de rappel de cocaïne après un sevrage plus ou moins prolongé (Segal et Kuczenski, 1992, Henry et White, 1995, Li et al, 2000).

Les animaux traités selon le profil intermittent ne présentent pas de sensibilisation locomotrice ou neurochimique alors que pour les animaux traités selon le profil binge, nous avons observé une sensibilisation après un jour de sevrage qui ne persiste pas après 14 jours. Il est possible que la sensibilisation neurochimique après un jour de sevrage pour ce groupe, soit responsable de la sensibilisation locomotrice, car la dopamine est impliquée dans le control moteur et a déjà été associée à une sensibilisation locomotrice (Pontieri et al, 1995, Cadoni et al, 1999).

Il a été décrit que la sensibilisation comportementale est une adaptation spécifique de l'administration répétée d'un psychostimulant (Woolverton et Johnson, 1992, Kalivas et al, 1992). Or, certaines études dans la littérature n'ont pas non plus observé de sensibilisation après l'administration de 30mg/kg de cocaïne en intrapéritonéale pendant 3 jours (Kalivas et al, 1988) ou 18 jours (Robertson et al, 1990). Nous avons mis en évidence ici, que ce comportement pouvait être développé par certains profils d'administration mais pas par d'autres. Ceci est en accord avec la littérature car il semblerait que le profil d'administration soit important pour la détermination de l'intensité et de la durée de la sensibilisation (Kalivas et Duffy, 1993b, Vanderschuren et al, 1997, Le Marec et al, 2011). Ce comportement est un marqueur prédictif d'autres adaptations liées à la dépendance et serait associée à un état addictif avancé (Vanderschuren et Kalivas, 2000). Ceci est observé dans nos conditions pour le groupe binge mais pas pour le groupe intermittent qui doit encore faire preuve de plasticité et serait encore capable de réguler les réponses vis-à-vis des effets stimulants de la cocaïne.

En plus de l'analyse de la réponse locomotrice et dopaminergique, l'analyse de la réponse comportementale à une injection de rappel de cocaïne dans un nouvel environnement, a permis de mettre en évidence des différences dans les réponses exploratoires et stéréotypées, en fonction du profil d'administration. Ce test a été réalisé afin d'observer la réponse comportementale immédiate à une dose de rappel et la réponse comportementale au moment où le maximum d'action de la cocaïne sur la libération de dopamine et le comportement est atteint (à + 30 minutes) (Segal et Kuczenski, 1992, Kalivas et Duffy, 1993a et b). Avec ce test, nous avons aussi pu comptabiliser les stéréotypies qui sont des comportements caractéristiques des effets des psychostimulants et qui n'ont été visibles que lorsque les animaux étaient sous l'effet de la drogue (Kelly et al, 1975).

L'analyse de la réponse exploratoire des animaux traités selon le profil intermittent, montre que ces animaux répondent de façon moins importante par rapport à des animaux naïfs et cela est visible jusqu'à 30 minutes après l'injection de cocaïne après un jour de sevrage. Après 14 jours de sevrage, cette diminution de la réponse exploratoire des animaux intermittents par rapport à leurs contrôles saline, n'apparaît que 30 minutes après l'injection de rappel de cocaïne. Ces animaux du groupe intermittent ont également développé une sensibilisation des stéréotypies après un jour de sevrage et après 14 jours de sevrage, en réponse à l'injection de rappel de cocaïne.

Les animaux traités selon le profil binge ont quant à eux développé une sensibilisation exploratoire, après un jour de sevrage, 30 minutes après l'injection de rappel de cocaïne. Après 14 jours de sevrage, la réponse exploratoire n'est plus sensibilisée mais elle est inférieure à celles des animaux contrôles saline. Les stéréotypies exprimées par ce groupe d'animaux ne sont pas très importantes après un jour de sevrage et elles sont significativement inférieures à celles exprimées par les animaux

intermittents. Cependant, après 14 jours de sevrage elles sont augmentées par rapport à des animaux naïfs et atteignent un niveau similaire à celui des animaux intermittents.

Lors des observations réalisées au cours de ce test, nous avons pu voir que les stéréotypies sont majoritairement exprimées lors de phases d'immobilité (observations qualitatives). L'expression des stéréotypies se fait donc au détriment de l'expression d'une activité locomotrice, et cela pourrait refléter des altérations de la voie motrice nigro-striée. En effet, il a été montré que c'est la dopamine nigro-striée qui serait associée aux comportements stéréotypés, tandis que la dopamine mésolimbique serait responsable des réponses locomotrices de la sensibilisation (Kelly et al, 1975, Sharp et al, 1987, Wolf et al, 1998).

Ceci est cohérent avec le fait que lorsque les animaux expriment de nombreuses stéréotypies (+1 jour et +14 jours de sevrage pour les intermittents et +14 jours de sevrage pour les binge), leur réponse exploratoire est moins importante. Les défauts d'augmentation de l'activité locomotrice en réponse à une injection de rappel de cocaïne observés dans ce test, n'ont donc pas été interprétés comme des tolérances car cela était dû au fait que les animaux exprimaient de nombreuses stéréotypies. L'hyperstimulation provoquée par la cocaïne serait donc exprimée différemment selon le profil d'administration. En effet, après un jour de sevrage, les animaux traités selon le profil intermittent répondent principalement par des stéréotypies au détriment de la locomotion alors que les animaux traités selon le profil binge répondent principalement par une hyper locomotion, au détriment des stéréotypies.

D'après ces résultats, nous pouvons penser que chaque profil d'administration a induit des modifications principalement dans une des deux voies dopaminergiques après un jour de sevrage. Les animaux intermittents auraient plutôt développé des perturbations dans la voie nigro-striée, tandis que pour les animaux binge ce serait plutôt des perturbations dans la voie mésolimbique. Après 14 jours de sevrage, les animaux binge n'expriment plus de sensibilisation locomotrice et leur nombre de stéréotypies atteint celui des intermittents. Ceci peut signifier que les altérations neurobiologiques de ce profil d'administration qui avaient principalement lieu dans la voie mésolimbique après un jour de sevrage, laissent place à des perturbations plus intenses dans la voie nigro-striée après un sevrage prolongé.

Les modifications de la densité des récepteurs dopaminergiques semblent être en accord avec ces observations comportementales. En effet, les animaux du profil intermittent ont développé des modifications des D1-like uniquement dans la voie nigro-striée après 14 jours de sevrage, or il a été mis en évidence que les stéréotypies seraient dépendantes des D1-like chez des animaux ayant reçu des administrations répétées de cocaïne (McCreary et Marsden, 1993, Karler et al, 1998). Il est possible que les modifications de la densité des D1-like après 14 jours de sevrage, soient le résultat

de perturbations de leur activité dans la voie nigro-striée après un jour de sevrage qui entraînait une forte expression de stéréotypies.

Pour les animaux traités selon le profil binge, les modifications de la densité des D1-like et des D2-like semblent être en accord avec la sensibilisation comportementale observée après un jour de sevrage pour l'activité locomotrice et exploratoire. En effet, l'augmentation de la densité des D1-like dans la substance noire pourrait être associée à une augmentation de la réactivité neuronale de la voie motrice, ce qui pourrait expliquer l'augmentation plus importante de la locomotion pour ce profil d'administration en réponse à une dose de rappel de cocaïne. De plus, la diminution de la densité des récepteurs D1-like au niveau des terminaisons dopaminergiques (caude putamen et noyau accumbens) a déjà été observée lors d'un traitement induisant une sensibilisation comportementale (Kleven et al, 1990) et cette diminution a été associée à une augmentation de la sensibilité de ces récepteurs (Henry et White, 1991), favorisant la réactivité neuronale face à une stimulation dopaminergique (Beurrier et Malenka, 2002). Pour les récepteurs D2-like une diminution au niveau des terminaisons dopaminergiques dans le caude putamen et le noyau accumbens pourrait refléter une diminution de l'inhibition de la neurotransmission dopaminergique, qui pourrait participer à l'expression de la sensibilisation comportementale.

Après 14 jours de sevrage, les adaptations des récepteurs sont différentes par rapport à un jour de sevrage, en effet, seules des diminutions de ces récepteurs ont été observées dans les structures analysées. Ces modifications différentes pourraient expliquer que la sensibilisation locomotrice ne soit plus observable et pourraient être le résultat d'une trop forte stimulation induite par l'administration répétée de cocaïne selon ce profil d'administration.

4. Résultats attendus pour le glutamate.

Après l'étude des modifications du système dopaminergique, suite à une administration répétée de cocaïne, un second objectif de ce travail est d'analyser les modifications de l'administration répétée de cocaïne sur le système glutamatergique. Ce second système fait partie intégrante du système mésocorticolimbique et est en interaction étroite avec le système dopaminergique (Kalivas et al, 2009).

Les perturbations du système glutamatergique ont principalement lieu dans le core du noyau accumbens (Pierce et al, 1996, Miguens et al, 1999, Mc Farland et al, 2003). En effet, le glutamate est impliqué de façon plus importante dans la dépendance, lorsqu'une association conditionnée est mise en place entre l'effet renforçant et un stimulus (indice ou environnemental) (Wolf et al, 1998). Or le core du noyau accumbens est associé aux comportements appris et conditionnés, contrairement au shell qui est associé aux effets renforçants de stimuli non appris (Henk et Groenewegen, 2007).

La mesure de la quantité de glutamate extracellulaire selon le même protocole d'analyse que celui qui a été fait pour la dopamine, nous permettra peut-être de révéler des variations cohérentes entre le glutamate et la dopamine ou de mettre en évidence des perturbations de la régulation entre les deux systèmes.

Il est possible que nous parvenions à l'observation d'une variation particulière à l'heure d'injection, qui serait cohérente avec la variation observée pour la dopamine lors de l'anticipation de l'effet renforçant de la cocaïne. Ceci pourrait impliquer les structures émettant les afférences glutamatergiques vers le noyau accumbens comme le cortex préfrontal, l'hippocampe ou l'amygdale qui contiennent les informations mnésiques et qui permettent de donner une valence émotionnelle et décisionnelle à des stimuli environnementaux.

Conclusion.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence que le profil selon lequel est administrée la cocaïne a une importance cruciale dans les modifications neurobiologiques qu'il induit. Les comportements caractéristiques de la prise répétée de cocaïne, tel que la sensibilisation ou l'expression de stéréotypies n'ont pas été développées par nos deux profils d'administration. En effet, le groupe intermittent a développé une sensibilisation des stéréotypies et une anticipation neurochimique et locomotrice forte des effets renforçants de la cocaïne à l'heure habituelle d'injection. Le groupe binge a quant à lui, développé une sensibilisation comportementale et dopaminergique, sans modification de l'expression de stéréotypies et une anticipation des effets renforçants de la cocaïne moins importante que pour le profil intermittent. L'ensemble de ces modifications comportementales et neurochimiques ont été associées à des modifications des récepteurs au niveau cellulaire très différentes, qui pourraient être la cause des différentes adaptations comportementales (Tableau 14).

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces trois années de thèse nous ont permis de montrer que le profil d'administration selon lequel est administrée la cocaïne est très important. Cette découverte permet d'envisager de nouvelles perspectives d'analyse des effets d'une prise répétée de cocaïne, notamment une nouvelle considération rigoureuse du protocole de traitement utilisé dans chaque étude. D'un point de vue fondamental, nous savons maintenant que les résultats obtenus avec des profils d'administration de cocaïne différents ne peuvent pas être comparables. Nous mettons en avant ici que chaque étude sur les effets de la cocaïne n'a de valeur fondamentale que pour le profil d'administration étudié. Par ailleurs, il a été démontré que des adaptations neurobiologiques et comportementales différentes étaient induites par des profils d'administration différents de morphine chez la souris (Le Marec et al, 2011) et chez le rat (Vanderschuren et al, 1997). Ceci pourrait donc être extrapolable à l'ensemble des substances toxicomanogènes.

Nous mettons également en évidence ici qu'en fonction de l'heure à laquelle ont été faites les mesures, nous n'avons pas observé les mêmes adaptations comportementales ou neurochimiques au sein d'un même profil d'administration de cocaïne. Cela montre que l'heure à laquelle les analyses sont faites est très importante et doit être prise en compte dans les études futures.

Nous savons que les cocaïnomanes consomment la cocaïne de façon différente selon leur âge ou leur classe économique et sociale. Malgré des études ayant déterminé des cibles thérapeutiques prometteuses, tel que des agonistes (Spealman et al, 1999) ou des antagonistes dopaminergiques (Christopher Pierce et al, 2012), des traitements substitutifs (Peng et al, 2010, Velasquez-Sanchez et al, 2012) ou encore des antidépresseurs (Lima et al, 2002, 2003), les études cliniques n'ont pour le

moment pas abouti à des résultats concluants (Christopher Pierce et al, 2012, Lima et al, 2002, Mendelson et Mello, 1996) pour le développement d'un traitement efficace pour les cocaïnomanes. Ceci pourrait s'expliquer d'une part, par le fait que la plus part des tentatives de traitement thérapeutiques ne considèrent qu'une seule cible centrale et ne prennent pas en compte un ensemble de perturbations mises en place dans un système central complexe. D'autre part, il a été rapporté qu'il existe une grande variabilité de réponse des patients dans les différentes études cliniques (Lima et al, 2002, Mendelson et Mello, 1996), ce qui pourrait être dû au fait que les patients ont développé des adaptations neurobiologiques différentes selon leur profil de consommation de cocaïne.

Il faudrait par conséquent développer une thérapie spécifique avec des cibles appropriées selon les modifications centrales propres à chaque profil de consommation. Pour pouvoir définir ces modifications centrales et adapter les traitements thérapeutiques, il serait nécessaire de trouver un marqueur qui pourrait refléter au niveau périphérique les adaptations centrales provoquées par la cocaïne.

Tableau 14. Récapitulatif des adaptations comportementales et neurochimiques induites par nos deux profils d'administration de cocaïne.

		Profil Intermittent			Profil Binge		
		Niveau de base	Heure d'injection	Réponse à une dose de rappel	Niveau de base	Heure d'injection	Réponse à une dose de rappel
+ 1 jour	Comportement	---	Augmentation locomotrice	Sensibilisation des stéréotypies	---	---	Sensibilisation comportementale
	Neurochimie (taux de dopamine dans le Nac core)	Diminution DA	Augmentation DA	---	Diminution DA	Augmentation DA	Sensibilisation DA
+ 14 jours	Comportement	---	---	Sensibilisation des stéréotypies	---	---	---
	Neurochimie (taux de dopamine dans le Nac core)	---	Augmentation DA	---	---	---	---

--- : pas de modification, DA : dopamine

Perspectives

De nombreux points restent en suspens dans la compréhension des différentes adaptations comportementales et neurobiologiques mises en place selon chaque profil d'administration de cocaïne.

La mise en place et l'expression de la dépendance à la cocaïne se fait par des perturbations complexes d'un ensemble de systèmes en interaction dans le système nerveux central. Afin d'élargir notre étude à l'ensemble des systèmes mis en jeu lors des processus de l'addiction, l'analyse des conséquences de nos deux profils d'administration sur les autres neurotransmetteurs impliqués dans la dépendance serait nécessaire, comme l'étude des autres catécholamines (sérotonine, noradrénaline), du principal neurotransmetteur inhibiteur central (le GABA) ou encore du principal neurotransmetteur excitateur central (le glutamate qui est en cours de dosage dans le noyau accumbens core). Les perturbations de la neurotransmission induites par la prise répétée de cocaïne se font dans l'ensemble des structures du système dopaminergique (aire tegmentale ventrale, substance noire, noyau accumbens, caude putamen et cortex préfrontal) et dans les structures influençant l'activité de ce système (hippocampe, amygdale et pallidum ventral). Il est possible que chaque profil d'administration ait perturbé l'ensemble du système différemment.

Plus précisément, nous avons pu voir que selon les adaptations comportementales mises en évidence, chaque profil d'administration semble avoir développé des perturbations principalement dans un des deux systèmes dopaminergique (mésolimbique pour le profil binge et nigro-strié pour le profil intermittent). Bien que nous ayons confirmé que le profil binge a induit des perturbations de la neurotransmission dopaminergique dans la voie mésolimbique par la sensibilisation neurochimique après un jour de sevrage dans le noyau accumbens core, l'altération essentiellement de la voie nigro-striée par le profil intermittent reste à démontrer. Il serait donc intéressant de voir si le nombre important de stéréotypies développées par le profil intermittent serait causé par une sensibilisation au niveau des terminaisons de la voie motrice dans le caude putamen, par opposition avec le noyau accumbens pour les animaux binge. Si cela est confirmé, nous pourrions ainsi renforcer nos résultats actuels et montrer que selon le profil d'administration de cocaïne, les altérations centrales mettent en jeu des systèmes centraux différents.

Au sein du noyau accumbens, l'analyse de la modification des taux de dopamine extracellulaire a été faite dans la région du core, or le noyau accumbens est aussi constitué du shell qui est plus impliqué dans la réponse aux effets renforçants d'un stimulus (Ikemoto et al, 2007). Il serait donc intéressant de voir quel type de modification a lieu dans le shell pour les taux de base de dopamine extracellulaire selon chaque profil d'administration.

Un autre aspect à approfondir à la suite de cette étude est l'anticipation neurochimique dopaminergique et comportementale mis en évidence aux heures d'injection. D'abord, il serait intéressant de voir si ce processus est mis en place pour d'autres substances induisant un renforcement. Ensuite, comme nous l'avons suggéré, il serait intéressant de savoir quelle est l'implication du rythme circadien dans ces processus d'anticipation. Nous savons que l'anticipation locomotrice est régulée par un rythme circadien géré par l'oscillateur de la récompense dont la localisation centrale n'a pas encore été définie (Jansen et al 2012). Afin de voir si l'anticipation dopaminergique est réellement liée à l'anticipation comportementale, il faudrait savoir si elle est également sous le contrôle de l'oscillateur de la récompense et pas de l'oscillateur du cycle jour/nuit, le noyau suprachiasmatique (NSC). Ceci pourrait être fait en étudiant la mise en place de l'anticipation neurochimique et comportementale suite à l'administration de cocaïne selon le profil chez des animaux dont le NSC aurait été lésé. Ensuite, il faudrait voir si le NSC est nécessaire à l'expression de l'anticipation dopaminergique, en inactivant cette structure uniquement à l'heure habituelle d'injection chez des animaux ayant été traités selon le profil intermittent. Si l'anticipation dopaminergique est toujours observable, malgré les lésions ou inhibitions du NSC, cela signifierait que ce phénomène est sous l'influence d'un régulateur différent de celui qui régule les cycles jour/nuit. Cela pourrait donc être l'oscillateur de la récompense qui régule la recherche de drogue (Bass et al, 2010) et l'anticipation comportementale de la prise de cocaïne (Davidson et al, 2005, Jansen et al, 2012).

D'un point de vue génétique et moléculaire, il serait intéressant d'étudier le profil d'expression des gènes de l'horloge à l'heure habituelle d'injection par rapport aux heures de base. En effet, la cocaïne perturbe la régulation de gènes circadiens (Abarca et al, 2002) et la consommation de psychostimulants implique aussi des gènes circadiens non canoniques, dont la régulation est indépendante du NSC (Mohawk et al, 2008). Des modifications de l'expression des gènes à l'heure d'injection de cocaïne pourraient être à l'origine des modifications de la dopamine et du comportement.

DEUXIEME PARTIE : A LA RECHERCHE D'UN BIOMARQUEUR POUR L'ADDICTION

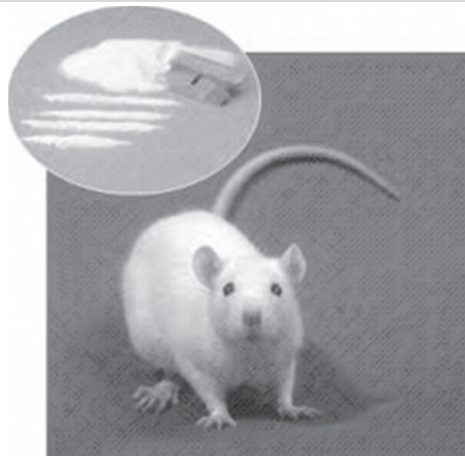
Le travail réalisé dans la première partie de cette thèse a consisté à comparer les conséquences de deux profils d'administration répétée de cocaïne chez le rat sur le système nerveux central. Nous avons montré, à différents temps de sevrage, des différences d'adaptations comportementales, neurochimiques et cellulaires pour les systèmes dopaminergiques en fonction du profil d'administration de la cocaïne.

L'extrapolation à la clinique implique que chaque patient cocaïnomane développerait des modifications neurobiologiques centrales différentes selon son profil de consommation.

Il est donc nécessaire de trouver un biomarqueur périphérique, qui permettrait d'évaluer les altérations centrales propres à chaque profil de consommation de cocaïne.

Pour ce faire, nous nous sommes intéressés, à la mise en évidence d'un biomarqueur périphérique dont les variations pourraient être représentatives des différentes adaptations cérébrales observées chez le rat.

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE – DEUXIEME PARTIE



1. Le BDNF.

a. Synthèse et maturation.

Le BDNF (Brain Derived-Neurotrophic Factor), isolé pour la première fois en 1982 par Barde et collaborateurs, fait partie de la famille des neurotrophines. Il intervient dans la croissance et l'orientation axonale ainsi que dans la maturation et la plasticité synaptique, lors du développement mais aussi à l'âge adulte.

Le gène codant pour le BDNF comprend neuf promoteurs régulant la transcription de neuf exons (I à IX). Le nombre important d'exons de ce gène rend la régulation de son épissage très complexe. Cette régulation dépend notamment de la méthylation de l'ADN, spécifique à chaque structure cérébrale et à chaque compartiment biologique mais aussi de l'activité neuronale (Autry et Monteggia, 2012).

Le BDNF est d'abord synthétisé sous forme de protéine précurseur, le prépro-BDNF qui est ensuite clivé en pro-BDNF (35kDa). Le BDNF mature (14 kDa), qui résulte du clivage du pro-BDNF est produit soit au niveau périphérique, après sécrétion de pro-BDNF via l'activité de l'enzyme plasminogène (Lu et al, 2003) soit au niveau intracellulaire dans les neurones où il est stocké afin d'être sécrété de façon dépendante à l'activité neuronale (Matsumoto et al, 2008). Bien qu'étant un précurseur du BDNF mature, le pro-BDNF a également une incidence sur l'activité et la plasticité neuronale. Il a été démontré qu'il active des voies de signalisation différentes et indépendantes de celles du BDNF puisqu'il agirait via le récepteur pro-apoptotique p75 (McGinty et al, 2011). Le BDNF mature quant à lui se lie avec une forte affinité sur le récepteur Tropomyosine-related kinase B (TrkB) (Klein et al, 1991).

b. Le récepteur TrkB et les voies de signalisation activées.

Le récepteur TrkB est un récepteur de la famille des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) dont l'activation par son ligand (le BDNF) entraîne la dimérisation de deux sous unités et leur autophosphorylation au niveau de tyrosines sur les segments intracellulaires. Le récepteur ainsi activé stimule l'activation de voies de transductions spécifiques au récepteur (figure 12).

Trois voies de signalisation majeures sont activées par le couple BDNF-TrkB : la voie de la PLC γ (phospholipase C gamma) entraînant l'activation de la pK ζ (protéine kinase C), la voie des PI3K (phosphatidyl-inositol-3-kinase) conduisant à l'activation de la serine/thréonine kinase AKT et la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase) activant la protéine kinase ERK (extracellular related kinase) (figure 34). Ces trois voies aboutissent à des régulations synaptiques et neuronales par le BDNF mais leurs conséquences cellulaires ont des cinétiques différentes.

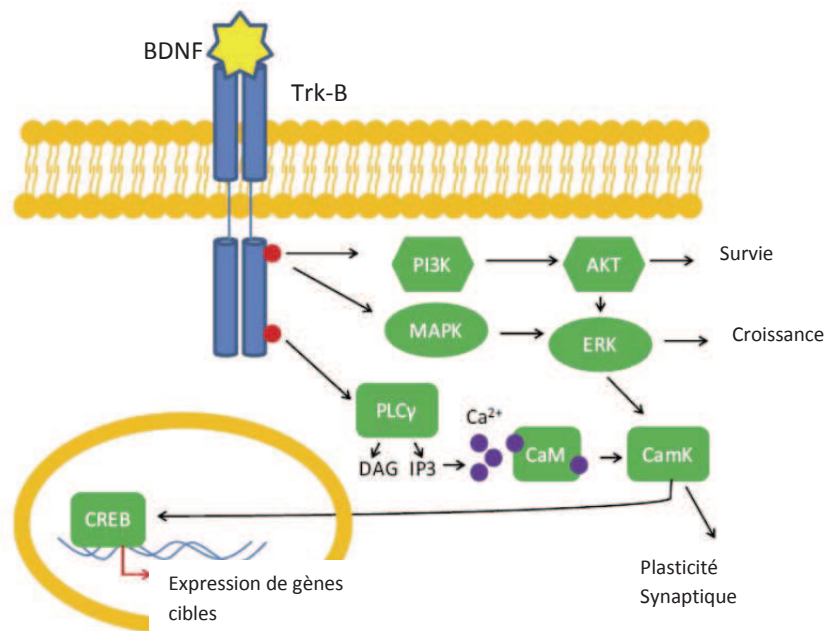


Figure 34. Voies de signalisation du récepteur TrkB activées par le BDNF.

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinases, AKT ou PKB : phosphor kinase B, MAPK : Mitogen activated kinase, ERK : extracellular-signal regulated kinase, PLC : Phospholipase C, CaM : Calmoludine, CaMK Calmoludine dependent kinase, CREB : cAMP response element-binding proetin) (D'après Autry et Monteggia 2012)

L'activation du récepteur TrkB par la présence de BDNF conduit en premier lieu à l'augmentation de la réactivité neuronale par l'augmentation de la conductivité membranaire grâce à la libération de Ca^{2+} par la voie PLC γ . Ceci permet l'augmentation de la conductivité des canaux NMDA et favorise la libération de neurotransmetteurs ainsi que la LTP initiale (Autry et Monteggia, 2012).

En second lieu, l'activation des voies MAP kinases et PI3 kinases induit la transcription de gènes cibles impliqués dans la formation de nouvelles synapses et dans la mise en place de la LTP tardive (Aicardi et al, 2004), via le facteur de transcription CREB (Ying et al, 2002 ; Opazo et al, 2003). Le BDNF active son récepteur et ces voies de signalisation pour la mise en place d'interactions neuronales dictées par la présence de facteurs ou de stimuli environnementaux et favorise l'équilibre de ces interactions.

2. Le BDNF, facteur neurotrophique du système mésocorticolimbique.

Parmi les neurotrophines, le BDNF est le plus exprimé à l'âge adulte dans le cerveau (Thoenen, 1995). C'est le facteur trophique des neurones catécholaminergiques et en particulier des neurones dopaminergiques (Mamounas et al, 2000 ; Sokoloff et al, 2002). Le BDNF est présent dans les structures du système mésocorticolimbique puisque les neurones pyramidaux du cortex préfrontal sont une source prédominante de BDNF (Altar et al, 1997) ainsi que les neurones dopaminergiques

bien défini mais des hypothèses sur son implication dans la régénération neuronale en cas de lésions périphériques ont été émises (Fujimura et al, 2002, Radka et al, 1996).

Cependant, l'intérêt pour le BDNF dans le compartiment sanguin vient du fait que les variations plasmatiques de cette protéine ont été corrélées avec ses variations dans le système nerveux central au cours de l'ontogénèse (Karege et al, 2002). Il existerait donc un mécanisme de régulation commun entre le BDNF sanguin et le BDNF cérébral.

De nombreuses études cherchant à établir le caractère de biomarqueur de cette molécule pour les maladies psychiatriques ont donc déjà été réalisées, notamment pour le cas de la dépression ou de la schizophrénie (Chu et al, 2011 ; Noto et al, 2011). Les taux de BDNF plasmatiques seraient inversement corrélés au niveau de dépression des patients (Chu et al, 2011) et pour des patients schizophrènes, une corrélation positive entre leur niveau dépressif et leurs taux de BDNF plasmatique a été rapportée (Noto et al, 2011). Chez le rat, il a été mis en évidence une augmentation des taux de BDNF sanguins corrélée à une diminution des taux de BDNF dans l'hippocampe dans un modèle de dépression (Elfving et al, 2010).

4. Le BDNF et la cocaïne.

Le BDNF est omniprésent dans le système mésocorticolimbique où il participe à l'équilibre de l'activité de ce système et à la mise en place de connections régies par les facteurs environnementaux. Dans le cas de la prise de drogue, cet équilibre est rompu et par conséquent le BDNF est également perturbé (Corominas et al, 2007). Il est capable d'interagir avec la mise en place des perturbations profondes induites par l'addiction. En effet son administration, dans des conditions précises, suite à une prise répétée de cocaïne, peut renforcer ou reverser l'intensité de plusieurs paramètres de l'addiction de façon structure dépendante (Horger et al, 1999, Lu et al, 2004, Graham et al, 2007, Berglind et al, 2007).

a. Effets aigus de la cocaïne sur le BDNF.

Le BDNF joue un rôle dans la mise en place de la dépendance à la cocaïne car son expression est modifiée dans certaines régions cérébrales, dès la première prise de drogue. En effet, il a été démontré qu'une dose aiguë de cocaïne provoquait une augmentation de l'ARNm du BDNF spécifiquement dans le shell (Filip et al, 2006 ; Graham et al, 2007). Cette augmentation dans le shell se fait de façon transitoire, entre 60 et 90 minutes après l'injection et aboutit à l'augmentation de la protéine de BDNF jusqu'à 24h après l'injection. Des analyses dans les cortex préfrontal et frontal ont également révélé une augmentation de l'expression du BDNF (Le Foll et al, 2005) entre 2h et 4h

après l'injection. Pierce et collaborateurs n'ont pas pu mettre en évidence de telles modifications après une injection aigüe en observant la protéine de BDNF dans l'aire tegmentale ventrale, la substance noire et l'hippocampe (Pierce et al, 1999). Cependant, une dernière étude a pu voir qu'une augmentation de BDNF avait lieu dans l'aire tegmentale ventrale à la suite d'une injection aigüe de cocaïne sans observer de variation dans le noyau accumbens (Graham et al, 2009). L'expression du BDNF est donc activée rapidement par la cocaïne dans certaines régions cérébrales, probablement dû au fait que le gène codant le BDNF fait partie des gènes précoces (Lauterborn et al, 1996) dont l'expression peut être activée par la cocaïne de façon transitoire.

L'administration aigüe de cocaïne chez des souris hétérozygotes pour le BDNF (BDNF+/-), conduit à une augmentation de la locomotion moins importante que chez des souris sauvages (Hall et al, 2003), ce qui montre qu'un défaut dans l'expression de BDNF altère l'effet stimulant de la cocaïne et que les augmentations précoces de BDNF sont importantes pour la mise en place et l'expression des effets de la cocaïne.

b. Effets d'une prise répétée de cocaïne sur le BDNF.

Le BDNF participe à la mise en place et à l'expression de la sensibilisation comportementale puisqu'une augmentation de l'ARNm du BDNF dans le noyau accumbens shell mais pas dans le core (Filip et al, 2006) est associée à l'expression de ce comportement. Chez les souris BDNF +/-, la mise en place de la sensibilisation est retardée par rapport à des souris sauvages (Horger et al, 1999). Il a également été mis en évidence que l'expression du récepteur TrkB était augmentée dans le noyau accumbens mais pas dans l'aire tegmentale ventrale suite à l'autoadministration de cocaïne, tandis que l'administration passive de cocaïne a induit une augmentation de l'expression du récepteur TrkB dans l'aire tegmentale ventrale et pas dans le noyau accumbens (Graham et al, 2009). Ces observations ont pu être faites immédiatement à la fin des sessions de traitement et la mesure de récepteurs TrkB après un jour de sevrage montre qu'ils reviennent à la normale dans ces deux structures.

Le BDNF est aussi impliqué dans l'expression d'un conditionnement contextuel à la cocaïne. La présentation d'un contexte associé à la prise de cocaïne chez des souris, entraîne une augmentation de l'activité locomotrice ainsi qu'une augmentation du BDNF dans l'aire tegmentale ventrale (Le Foll et al, 2002). De plus la mise en place d'une préférence de place conditionnée à la cocaïne n'est pas possible chez des souris hétérozygotes pour le BDNF (+/-) (Hall et al, 2003) et une délétion conditionnelle (par *knockdown*) du gène BDNF ou TrkB dans le noyau accumbens ou du gène BDNF dans l'aire tegmentale ventrale, induit une diminution de la préférence pour le compartiment associé à la cocaïne chez le rat (Graham et al, 2009). Le BDNF est donc nécessaire dans l'association d'une

prise de cocaïne avec un contexte. Ceci est en accord avec le fait que le BDNF module la plasticité synaptique et notamment les mécanismes moléculaires de l'apprentissage et de la mémorisation, tel que la LTP. Pourtant, la délétion conditionnelle (par *knockdown*) de TrkB dans le noyau accumbens n'altérerait pas l'acquisition d'une autoadministration de cocaïne mais affecterait uniquement la quantité de cocaïne auto administrée une fois que le comportement est acquis (Graham et al, 2009). En plus d'être lié aux effets comportementaux de la cocaïne, le BDNF est aussi impliqué dans les neuroadaptations à long terme induites par un sevrage. Grimm et collaborateurs ont montré en 2003, qu'il existait une incubation du sevrage à la cocaïne, c'est-à-dire une augmentation de la vulnérabilité à la rechute en présence du contexte conditionnant, associée à une augmentation du BDNF dans le noyau accumbens, dans l'aire tegmentale ventrale et dans l'amygdale. L'augmentation de la recherche de drogue avec la durée de sevrage, peut être reliée à une augmentation de la réactivité neuronale aux stimuli environnementaux provoquée par l'augmentation de BDNF. Pour appuyer cela, une étude d'électrophysiologie sur tranches a montré qu'une augmentation de BDNF dans l'aire tegmentale ventrale provoquée par un sevrage, facilite l'activation des neurones dopaminergiques et conduit à une LTP en présence de stimuli des afférences glutamatergiques corticales (Pu et al, 2006). Ces stimuli des afférences glutamatergiques vers l'aire tegmentale ventrale sont provoqués, in vivo, par la présence d'indices associés à la prise de cocaïne. Cela traduit donc que le BDNF participe à la vulnérabilité de rechute en présence d'indices environnementaux associés à la cocaïne en augmentant la réactivité des neurones dopaminergiques dans l'aire tegmentale ventrale. Cela est spécifique du BDNF car aucune modification des taux d'un autre facteur neurotrophique central, le NGF, ne sont observés au cours d'un sevrage à la cocaïne (Grimm et al, 2003).

5. Un facteur neurotrophique modulateur de la dépendance à la cocaïne.

L'injection directe de BDNF dans les structures mésocorticolimbiques a une influence sur les effets stimulants de l'administration répétée de cocaïne. Les effets de ces injections sont spécifiques de la structure ciblée.

Une injection de BDNF dans l'aire tegmentale ventrale (Lu et al, 2004) ou le noyau accumbens (Horger et al, 1999) et plus particulièrement le noyau accumbens shell (Graham et al, 2007), potentialise les effets de la prise répétée de cocaïne. En effet cela augmente à la fois, la recherche de drogue et la rechute ainsi que la motivation de recherche et la sensibilisation locomotrice induite par l'injection d'une nouvelle dose de cocaïne après un sevrage. Les effets du BDNF observés dans ces études sont dépendants du récepteur TrkB et passent par les voies de signalisations intracellulaires des MAP kinases (Lu et al, 2004) ou de la PLC gamma (Graham et al, 2007). Par ailleurs, une

diminution des taux de BDNF (par *knockdown* conditionnel) dans le noyau accumbens ou dans l'aire tegmentale ventrale, diminue la préférence de place conditionnée à la cocaïne et une diminution des taux de TrkB dans le noyau accumbens uniquement, diminue la préférence de place conditionnée et la quantité de cocaïne autoadministrée (Graham et al, 2009). Par conséquent, l'activation des récepteurs TrkB par le BDNF dans le noyau accumbens, favoriserait l'effet renforçant de la cocaïne et le développement d'une addiction à la cocaïne (Graham et al, 2009). Cet effet est commun aux psychostimulants car l'injection d'anticorps anti-BDNF ou anti TrkB dans le noyau accumbens diminue le pic de dopamine et les effets locomoteurs induits par une injection de méthamphétamine (Narita et al, 2003) et cela n'affecte pas la consommation de renforçants naturels tel que le sucre (Graham et al, 2007).

En revanche, le BDNF dans le cortex préfrontal atténue les effets d'une prise répétée de cocaïne. Une injection de BDNF dans le cortex préfrontal provoque une diminution des comportements de recherche et de rechute à la cocaïne après un apprentissage d'autoadministration. Cela permet également de rétablir les taux de base de BDNF, d'ERK phosphorylé et les taux de base de glutamate dans le noyau accumbens. De plus, cela permet de prévenir l'augmentation de glutamate dans cette structure induite par une injection de rappel cocaïne (Berglind et al, 2007 et 2009).

Ces effets modulateurs du BDNF variables selon la structure infusée, ne sont observés que si l'injection se fait pendant ou immédiatement après l'apprentissage (Lu et al, 2004 ; Berglind et al, 2007). La mémorisation est caractérisée par une période pendant laquelle la trace mnésique récemment acquise est dans un état instable et labile, c'est la consolidation. Le BDNF est donc capable d'intervenir sur une mémoire addictive lorsque la trace mnésique est encore instable et donc modifiable. De plus, cela n'a pas été observé dans le cas d'injections dans la substance noire ou le striatum, structures du système dopaminergique nigro-strié, ce qui traduit une spécificité d'action du BDNF dans le système mésocorticolimbique, étroitement liées aux structures mnésiques telle que l'hippocampe et l'amygdale (Lu et al, 2004 ; Graham et al, 2007 ; Berglind et al, 2007).

OBJECTIF ET HYPOTHESES – DEUXIEME PARTIE



Le BDNF est un bon candidat biomarqueur pour différentes maladies neuropsychiatriques telles que la dépression ou la schizophrénie (Chu et al, 2011, Noto et al, 2011).

L'utilisation de cette molécule comme biomarqueur pour l'addiction reste encore à définir. Il a été mis en évidence très récemment, que des modifications de BDNF plasmatique avaient lieu chez des patients cocaïnomanes (D'sa et al, 2011 ; McGinty et Mendelson, 2011, Hilburn et al, 2011). Pourtant aucune relation entre les taux de BDNF périphérique et les variations centrales n'a encore été faite.

Nous avons mis en évidence que différentes modifications neurobiologiques centrales se mettent en place selon le profil de consommation de cocaïne après un sevrage court et un sevrage long.

L'objectif de cette seconde partie est d'étudier les modifications du taux de BDNF induites selon nos deux profils d'administration de cocaïne après un jour et 14 jours de sevrage dans différents compartiments biologiques périphériques et centraux.

Le taux de BDNF a d'abord été mesuré en dehors des heures d'injection afin de déterminer les variations des taux basaux de cette neurotrophine. Ensuite, nous avons mesuré les taux de BDNF à l'heure habituelle d'injection pour les deux profils d'administration afin de voir si la mémoire neurochimique et comportementale mise en évidence dans l'étude précédente peut être reflétée par une modification des taux de BDNF.

A partir de nos deux profils d'administration utilisés précédemment :

- ➔ **Le profil intermittent** : une injection par jour de cocaïne (20mg/kg i.p.) à 10h, pendant 14 jours.
- ➔ **Le profil binge** : trois injections par jour de cocaïne (20mg/kg i.p.) à 10h, 13h et 16h, pendant 14 jours.

Après un jour et 14 jours de sevrage suite à ces deux profils d'administration, nous avons :

1. Etudié les variations basales de BDNF dans le plasma, le liquide céphalo-rachidien et dans deux structures cérébrales du système mésocorticolimbique : le noyau accumbens et le cortex préfrontal.

2. Etudié les variations de BDNF lors de l'anticipation des effets renforçants de la drogue en dosant ce facteur neurotrophique dans le plasma, le liquide céphalo-rachidien, le noyau accumbens et le cortex préfrontal exactement à l'heure habituelle d'injection.

TRAVAIL EXPERIMENTAL – DEUXIEME PARTIE



MATERIEL ET METHODES

Principe et paramètres des méthodes utilisées

1. Analyse des modifications du BDNF dans différents compartiments biologiques.

Principe :

Les taux de BDNF dans le sang, le liquide céphalo-rachidien, le noyau accumbens et le cortex préfrontal ont été dosés par dosage immuno-enzymatique.

L'Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) est une méthode de dosage biochimique immuno-enzymatique quantitatif non compétitif. Le kit de dosage utilisé met en œuvre une méthode de révélation sandwich indirecte.

Le principe consiste à fixer un anticorps anti-BDNF au fond des puits d'une plaque de 96 puits. Après incubation de l'échantillon à doser, la révélation de la présence de l'antigène d'intérêt (le BDNF) est faite grâce à l'incubation avec un anticorps primaire, reconnu par un anticorps secondaire couplé à de la peroxydase. Après ajout du substrat de cette enzyme, le signal émis dans chaque puits est mesuré par un spectrophotomètre à une longueur d'onde spécifique. L'intensité du signal est proportionnel de la quantité de BDNF présent dans chaque puits. Grâce à une gamme étalon réalisée en parallèle, une quantification précise de la quantité de BDNF dans chaque échantillon peut être faite (figure 34).

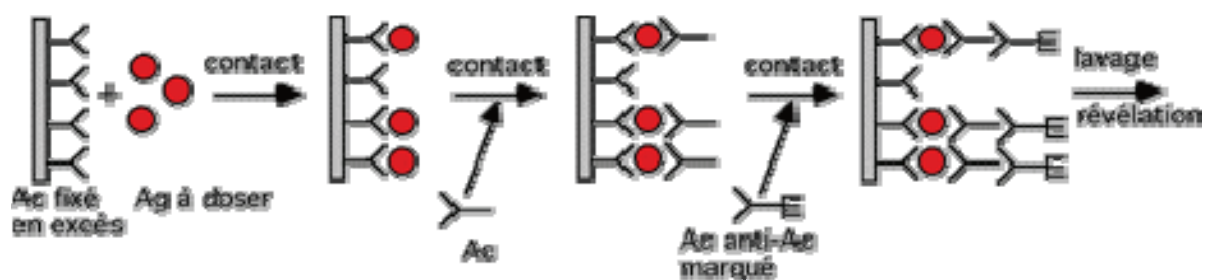


Figure 36. Dosage d'un antigène par la méthode ELISA double sandwich.

1) la solution d'échantillon contenant l'antigène d'intérêt est incubée dans des puits contenant un anticorps spécifique fixé en excès au fond des puits. 2) un anticorps est ensuite incubé en présence de l'antigène fixé sur les premiers anticorps. 3) un troisième anticorps, reconnaissant le deuxième et couplé à une enzyme comme la peroxydase est ajouté. 4) Après exposition d'un substrat chromogène de l'enzyme, le signal émis par chaque puits est quantifié et est proportionnel à la quantité d'antigène présent dans les puits.

Méthodes :

Procédures de prélèvement :

Le prélèvement de LCR a été fait par ponction dans la cavité suboccipitale sur les rats anesthésiés (au pentobarbital sodique 0,5ml par rat) et placé 5 minutes dans de la glace le temps de la décapitation des rats. Après la décapitation le sang artériel et veineux a été collecté dans des tubes coatés avec de l'EDTA (Terumo, Vanosafe, 3K).

En parallèle le cerveau des animaux a été prélevé rapidement et le cortex préfrontal médian et le noyau accumbens bilatéraux ont été disséqués (figure 37), prélevés et congelés dans le la carboglace, puis stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

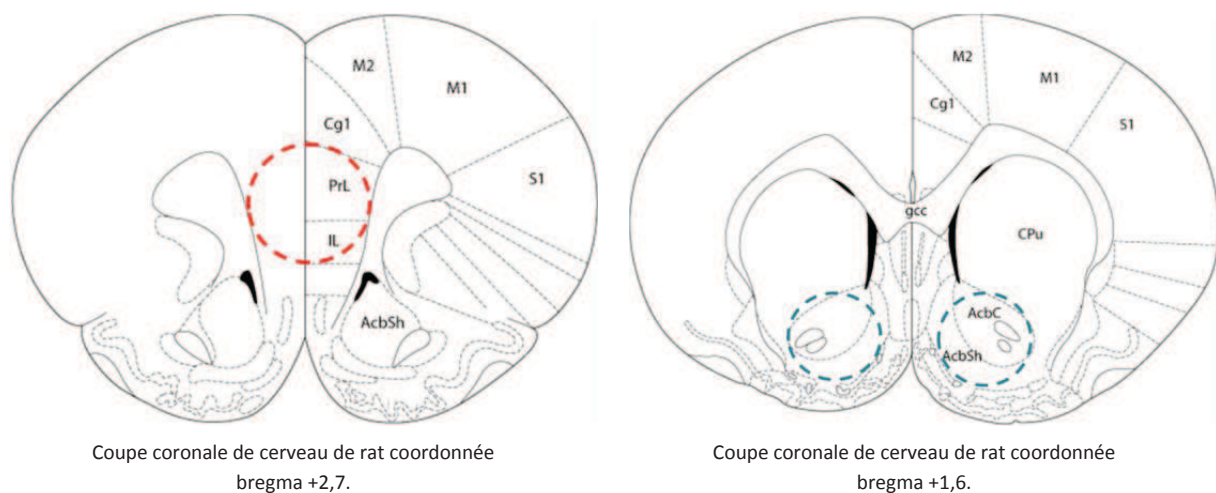


Figure 37. Zones de prélèvement des structures cérébrales pour le dosage de BDNF

Zones de prélèvement effectuées pour le dosage de BDNF dans le cortex préfrontal médian (pointillés rouges) et le noyau accumbens (pointillés bleus). (figures d'après Paxinos et Watson, 1998, AcbSh : noyau accumbens shell, AcbC : noyau accumbens core, CPU : Caude Putamen, Cg1 : cortex cingulaire aire 1, DP : cortex pedunculaire dorsal, gcc : genou du corps calleux, IL : cortex infralimbique, M1 : cortex moteur primaire, M2 : cortex moteur secondaire, PrL : cortex prélimbique, S1 : cortex somatosensoriel primaire)

Préparation du LCR :

Le LCR a été centrifugé (800g, 10 minutes à 4°C) et le surnageant a été récupéré et stocké à -80°C.

Préparation du plasma sanguin :

Le sang collecté dans les tubes coatés avec de l'EDTA a été maintenu à température ambiante pendant 30 à 60 minutes après le recueil. Après centrifugation (1500g, 10 minutes à 4°C), le surnageant a été récupéré et stocké à -80°C.

Préparation des tissus cérébraux :

Extraction des protéines totales : chaque prélèvement de tissus a été homogénéisé dans 350µl de tampon d'extraction protéique (400mM NaCl, 4mM EDTA, 0,05% azide de sodium, 0,5% de gélatine, 0,2% Triton X-100, 2% BSA et des tablettes d'inhibiteurs de protéases (Complete protease inhibitor mixture, Roche diagnostics A/S, Danemark)) et soniqués 30 secondes dans la glace. Les homogénats ont été centrifugés (11000g, 20 min à 4°C) et le surnageant récupéré et stocké à -80°C.

Détermination de la concentration de BDNF par ELISA :

La quantification du BDNF endogène a été réalisée avec des kits ELISA (BDNF E-max immunoAssay systems, Promega, Madison, USA). Chaque point de la gamme étalon ainsi que les échantillons (sauf pour le LCR, par manque de volume d'échantillon) ont été dosés en duplicata sans dissolution préalable, par conséquent le volume nécessaire par prélèvement après préparation était de 200µl. Les courbes étalon pour le dosage dans le plasma et le LCR ont été faites dans du tampon Block & Sample (Promega) et celles pour les dosages dans les tissus cérébraux ont été faites dans le tampon d'extraction protéique. Les courbes étalon allaient de 7,8 à 300 pg/ml.

Procédure : Dans de plaques de 96 puits (NUNK, Danemark) l'anticorps monoclonal anti BDNF de souris a été accroché par incubation dans tous les puits de la solution d'anticorps (100µl/puits), à 4°C toute la nuit.

Le lendemain, après blocage des sites non spécifiques avec le tampon Block & Sample, les échantillons à doser et les solutions de la gamme étalon ont été mis dans les puits en duplicata (100µl par puits), et laissés pendant 2h à température ambiante sous agitation. Après cela chaque puits a été incubé avec la solution d'anticorps polyclonal anti-BDNF humain (100µl/puits) pendant 2h à température ambiante sous agitation.

Enfin, un dernier anticorps anti-IgY HRP a été ajouté aux puits (100µl/puits) et laissé pendant 1h à température ambiante sous agitation.

Pour la coloration, le substrat de la peroxydase 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine a été ajouté à la fin de l'ensemble de ces étapes. La réaction de coloration a été stoppée par ajout d'acide chlorhydrique (1M) 10 minutes après. L'absorbance de chaque puits a été mesurée avec un lecteur de plaques à 450nm (Multiskan Ex, Thermo Electron Corporation).

Procédures expérimentales

1. Etude des modifications de BDNF induites par les deux profils d'administration.

Après les 14 jours de traitement à la cocaïne selon les deux profils d'administration, les taux de BDNF mature sont mesurés dans 4 compartiments biologiques.

- Mesure des taux de base de BDNF dans le sang, le LCR, le noyau accumbens et le cortex préfrontal après un jour et 14 jours de sevrage (figure 38).

Mesure des taux de base après un jour de sevrage : un jour après la fin des traitements les prélèvements de sang, LCR et de tissus cérébraux sont réalisés sur les rats à des heures qui ne correspondent pas aux heures auxquelles ils avaient l'habitude d'être injectés. Les échantillons prélevés sont conservés à -80°C jusqu'au moment des dosages de BDNF par ELISA.

Mesure des taux de base après 14 jours de sevrage : la même procédure qu'après un jour de sevrage a été réalisée. Les prélèvements sont réalisés le 27^{ème} jour, 14 jours après la dernière injection de chaque traitement, à des heures différentes de celles auxquelles les animaux avaient l'habitude de se faire injecter.

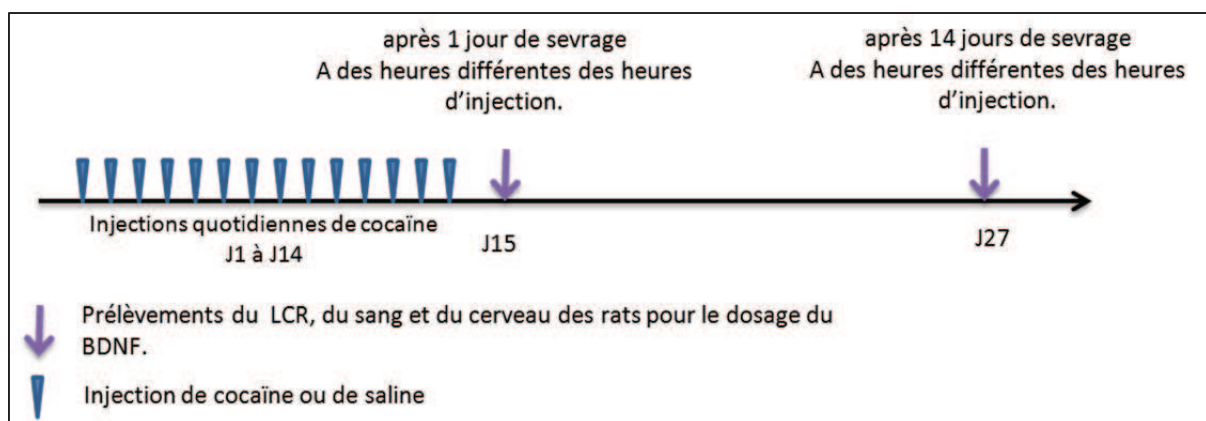


Figure 38. Procédure de mesure des variations de BDNF après les traitements à la cocaïne.

- Mesure des taux de BDNF dans le sang, le LCR, le noyau accumbens et le cortex préfrontal aux heures d'injection, après 1 jour et 14 jours de sevrage (figure 39).

Mesure des taux de BDNF aux heures d'injection après 1 jour de sevrage : un jour après la fin des traitements, les prélèvements de sang, de LCR et de tissus cérébraux sont réalisés, exactement 24

heures après la dernière injection de cocaïne (10h du matin pour le groupe intermittent et 16h pour le groupe binge)

Mesure des taux de BDNF aux heures d'injection après 14 jours de sevrage : la même procédure que pour 1 jour de sevrage a été utilisée. Les prélèvements sont réalisés le 27^{ème} jour, exactement à l'heure à laquelle les rats étaient injectés pendant les traitements, 14 jours après la dernière injection.

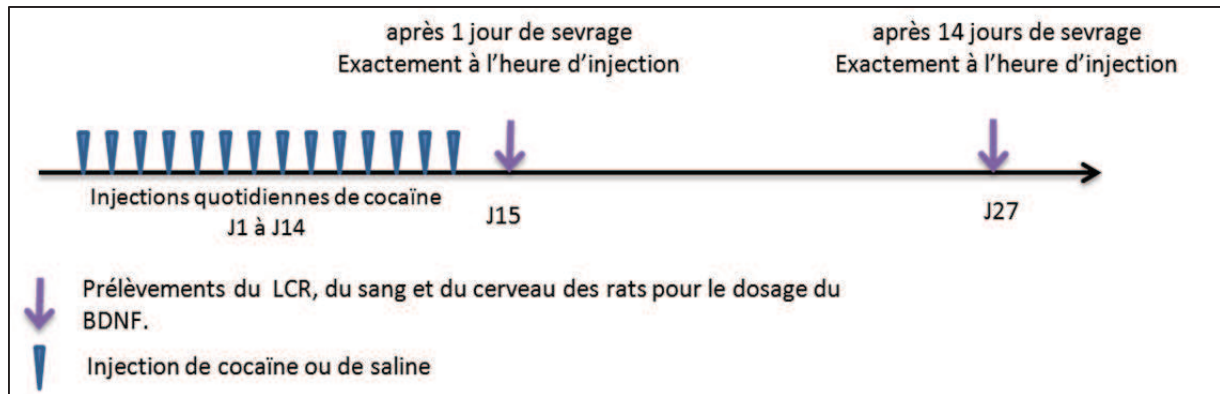


Figure 39. Procédure de mesure des variations de BDNF aux heures d'injections de la cocaïne.

RESULTATS

Objectif 1 : Etude des variations basales de BDNF

L'objectif de ce travail a été d'étudier les conséquences de nos deux profils d'administration de cocaïne sur les taux de base de BDNF, au niveau central et périphérique.

Nous avons analysé les variations des taux de BDNF dans le système mésocorticolimbique (cortex préfrontal, noyau accumbens), dans le liquide céphalo-rachidien et dans le plasma après un sevrage court (+ 1 jour) et un sevrage long (+ 14 jours).

a. Dosage des taux de base de BDNF après un jour de sevrage.

Après un jour de sevrage, le dosage des taux de base de BDNF à des heures ne correspondant pas aux heures d'injection, a permis de voir des variations dans le plasma sanguin, le LCR, le noyau accumbens et le cortex préfrontal, suite à la prise répétée de cocaïne.

Pour le profil intermittent, une diminution des taux de base de BDNF a été mise en évidence simultanément dans le plasma (figure 40a. $t_{(17)}=2.413$, $p<0.05$), dans le LCR (figure 40b. $t_{(10)}=2.547$, $p<0.05$) et dans le noyau accumbens (figure 40c. $t_{(10)}=4.239$, $p<0.01$).

Pour le profil binge, c'est une forte augmentation de BDNF qui est observée dans le plasma (figure 7a. $t_{(15)}=4.717$, $p<0.001$), accompagnée également d'une augmentation dans le noyau accumbens (figure 7c. $t_{(8)}=2.924$, $p<0.05$), en revanche, c'est une diminution qui est observée dans le LCR (figure 7b. $t_{(13)}=2.670$, $p<0.05$).

Dans le cortex préfrontal, aucune modification des taux basaux de BDNF n'a été observée, par rapport aux animaux traités avec du sérum physiologique, en conséquence aux deux profils d'administration après 1 jour de sevrage (figure 40d. intermittents : $t_{(15)}=0.0861$, $p=0.9325$; binges : $t_{(9)}=0.7849$, $p=0.4527$).

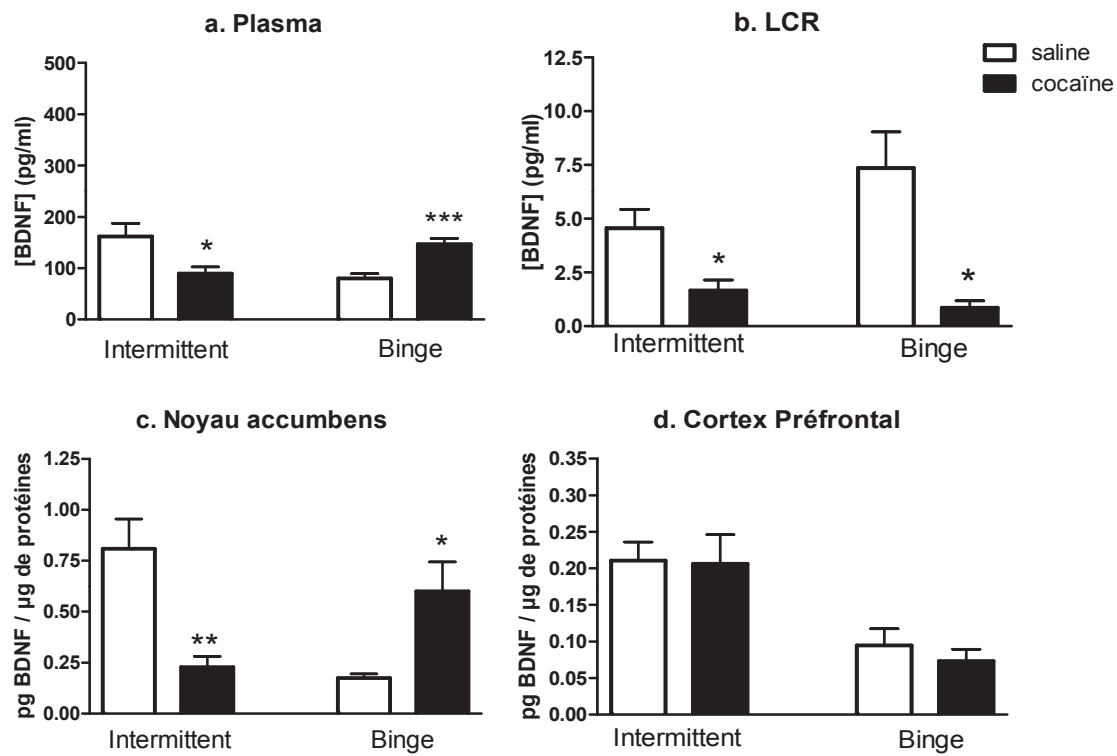


Figure 40. Mesure des taux de base de BDNF basal après un jour de sevrage.

Mesure des taux de BDNF par ELISA dans le plasma, le liquide céphalorachidien (LCR), le noyau accumbens et le cortex préfrontal à partir de prélèvements réalisés après un jour de sevrage à des heures ne correspondant pas aux heures habituelles d'injection de cocaïne pendant la durée des traitements. La comparaison des taux de base des animaux prétraités avec la cocaïne par rapport aux saline a été faite par comparaison des moyennes avec le test t de Student, $p < 0.05$ a été choisi comme seuil de significativité. Plasma : IS n= 10, IC n=9, BS n=10, BC n=7 ; LCR : IS n= 7, IC n=5, BS n=10, BC n=5 ; Noyau accumbens : IS n= 5, IC n=7, BS n=5, BC n=5 ; cortex préfrontal : IS n= 8, IC n=9, BS n=5, BC n=6. (Légende : *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

b. Dosage des taux de base de BDNF après 14 jours de sevrage.

Après 14 jours de sevrage, les animaux traités avec le profil intermittent ont une diminution des taux basaux de BDNF dans le plasma (figure 41a. $t_{(18)}=4.24$, $p<0.001$) et dans le LCR (figure 41b. $t_{(15)}=3.99$, $p<0.01$), tandis que dans le noyau accumbens et le cortex préfrontal il n'y a pas de différence significative avec les saline (figure 41c. noyau accumbens $t_{(11)}=0.379$, $p=0.71$; figure 41d. cortex préfrontal $t_{(10)}=1.14$, $p=0.28$). Pour le groupe binge, il n'y a plus de modification des taux de BDNF dans le plasma (figure 41a. $t_{(16)}=1.88$, $p=0.078$) mais une diminution dans les structures cérébrales (figure 41c. noyau accumbens $t_{(14)}=3.82$, $p<0.01$; figure 41d. cortex préfrontal $t_{(10)}=4.28$, $p<0.01$) et dans le LCR (figure 41b. $t_{(11)}=4.08$, $p<0.01$) a lieu été observée.

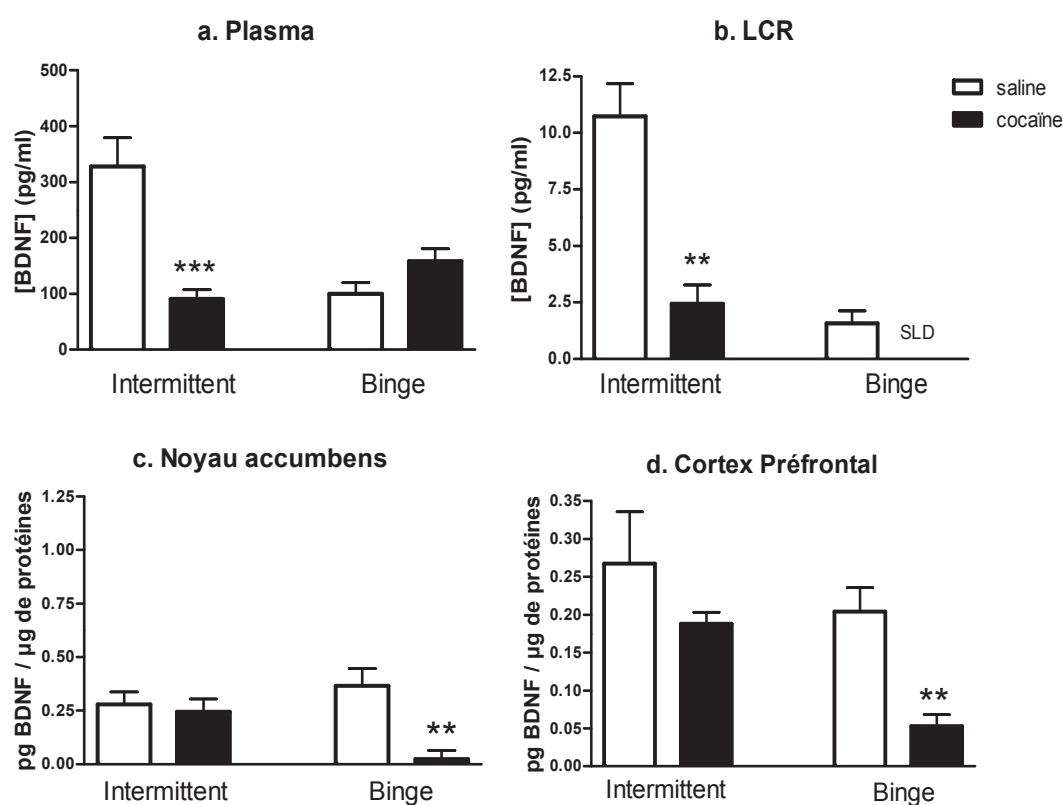


Figure 41. Mesure des taux de base de BDNF après 14 jours de sevrage.

Mesure des taux de BDNF par ELISA dans le plasma, le liquide céphalorachidien (LCR), le noyau accumbens et le cortex préfrontal à partir de prélèvements réalisés après 14 jours de sevrage à des heures ne correspondant pas aux heures d'injection de cocaïne pendant les traitements. La comparaison des taux de base des animaux prétraités avec la cocaïne par rapport aux saline a été faite par comparaison des moyennes avec le test t de Student, $p<0.05$ a été choisi comme seuil de significativité. Plasma : IS n= 10, IC n= 10 BS n=8, BC n=10; LCR : IS n= 11, IC n=6, BS n=7, BC n=6; Noyau accumbens : IS n= 8, IC n=5, BS n=8, BC n=8; cortex préfrontal : IS n= 6, IC n=6, BS n=6, BC n=6. (Légende : *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, SLD : Sous la Limite de Détection)

Objectif 2 : Etude des variations de BDNF lors de l'anticipation des effets renforçants de la drogue.

Le but de ce travail a été d'étudier les variations de BDNF exactement aux heures habituelles d'injection de cocaïne après un sevrage court et un sevrage long afin d'étudier l'implication de cette neurotrophine dans l'anticipation de l'effet renforçant de la cocaïne.

Nous avons analysé les variations des taux de BDNF aux heures habituelles d'injection, dans le système mésocorticolimbique (cortex préfrontal, noyau accumbens), dans le liquide céphalo-rachidien et dans le plasma après un sevrage court (+ 1 jour) et un sevrage long (+ 14 jours).

a. Dosage des taux de BDNF aux heures d'injection, après un jour de sevrage.

Le prélèvement des échantillons exactement à l'heure à laquelle les animaux avaient l'habitude de recevoir la cocaïne au cours des traitements a révélé des modifications du BDNF après un jour de sevrage dans les différents compartiments analysés, sans nouvelle réexposition à la drogue.

Une augmentation de BDNF par rapport aux taux de base a été mise en évidence dans le plasma (figure 42a. $t_{(16)}=2.510$, $p<0.05$) et dans le noyau accumbens (figure 42c. $t_{(13)}=2.529$, $p<0.05$), pour les animaux traités selon le profil intermittent. Au contraire, c'est une diminution dans ces deux compartiments qui a été observée pour les animaux traités selon le profil binge (plasma : figure 42a. $t_{(15)}=4.969$, $p<0.001$, noyau accumbens : figure 42c. $t_{(8)}=2.589$, $p<0.05$). Dans le LCR, aucune variation n'a été observée pour le profil intermittent (figure 42b. $t_{(9)}=2.236$, $p=0.522$) alors qu'une augmentation a été mise en évidence pour les animaux du profil binge (figure 42b. $t_{(11)}=2.810$, $p<0.05$). Nous n'avons pas mis en évidence de variation dans le cortex préfrontal aux heures d'injection pour les deux profils d'administration (figure 42d. intermittent : $t_{(14)}=0.7455$, $p=0.4683$, binge : $t_{(13)}=0.9498$, $p=0.3595$).

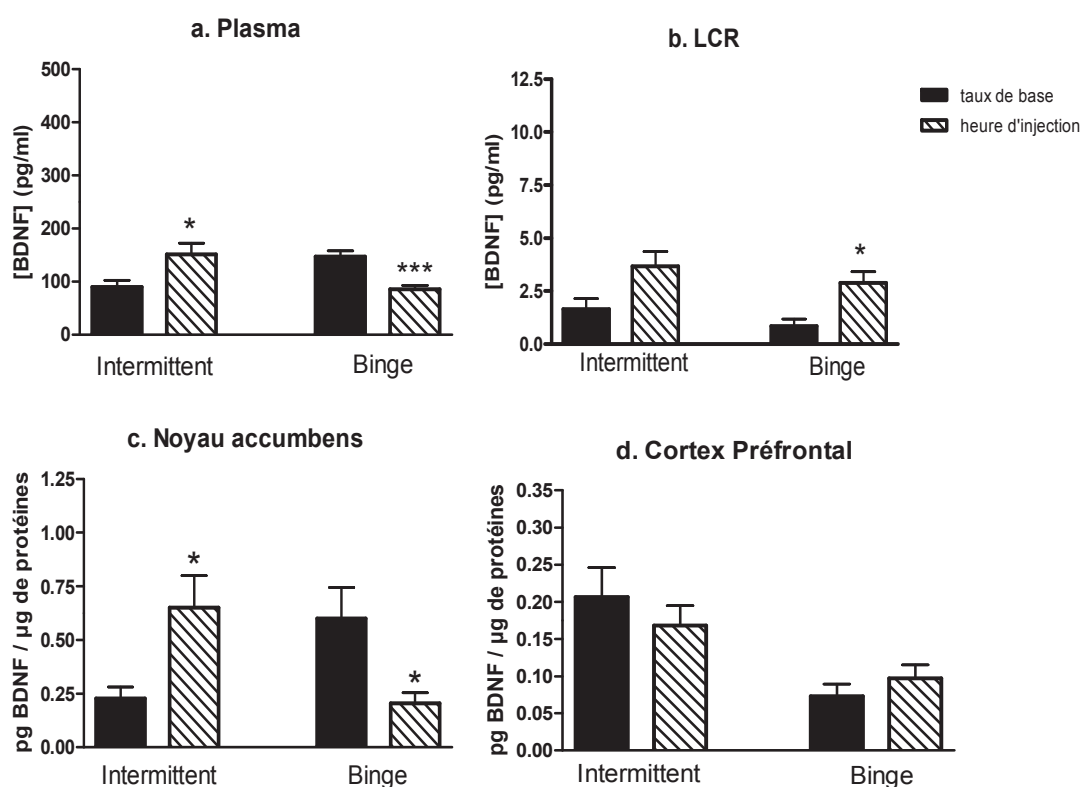


Figure 42. Mesure des taux de BDNF à l'heure d'injection de la cocaïne, après un jour de sevrage.

Mesure des taux de BDNF par ELISA dans le plasma, le liquide céphalorachidien (LCR), le noyau accumbens et le cortex préfrontal à partir de prélèvements réalisés après un jour de sevrage exactement à l'heure à laquelle les animaux avaient l'habitude de recevoir la cocaïne pendant les traitements (10 h pour les intermittents et 16 pour les binges). La comparaison des taux de base des animaux prétraités avec la cocaïne par rapport aux saline a été faite par comparaison des moyennes avec le test t de Student, $p < 0.05$ a été choisi comme seuil de significativité. Plasma : $IC_{(base)} n=9$, $IC_{(heure\ d'injection)} n=9$, $BC_{(base)} n=7$, $BC_{(heure\ d'injection)} n=10$; LCR : $IC_{(base)} n=5$, $IC_{(heure\ d'injection)} n=6$, $BC_{(base)} n=5$, $BC_{(heure\ d'injection)} n=8$; Noyau accumbens : $IC_{(base)} n=7$, $IC_{(heure\ d'injection)} n=8$, $BC_{(base)} n=5$, $BC_{(heure\ d'injection)} n=5$; cortex préfrontal : $IC_{(base)} n=9$, $IC_{(heure\ d'injection)} n=7$ / $BC_{(base)} n=6$, $BC_{(heure\ d'injection)} n=9$. (Légende : *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$).

b. Dosage des taux de BDNF aux heures d'injection, après 14 jours de sevrage.

Après 14 jours de sevrage, lorsque les taux de BDNF sont mesurés exactement aux heures auxquelles les rats ont eu l'habitude de recevoir la cocaïne des variations spécifiques pour chaque profil d'administration ont été observées (Figure 43).

Pour le groupe intermittent, une augmentation a lieu à la fois dans le plasma (figure 43a. $t_{(18)}=3.689$, $p<0.01$) et dans le LCR (figure 43b. $t_{(11)}=3.318$, $p<0.01$) et dans le noyau accumbens (figure 43c. $t_{(8)}=5.117$, $p<0.001$), et une diminution a lieu dans le cortex préfrontal.

Pour le groupe binge une augmentation des taux de BDNF a lieu dans les quatre compartiments biologiques analysés, sans réexposition à la drogue et exactement à l'heure à laquelle les animaux ont reçu la cocaïne pendant les traitements 14 jours auparavant (figure 43a. Plasma : $t_{(18)}=2.233$, $p=0.038$; figure 43b. LCR : $t_{(14)}=1.740$, $p=0.104$; figure 43c. Noyau accumbens : $t_{(13)}=3.903$, $p<0.01$; figure 43d. Cortex préfrontal : $t_{(9)}=2.525$, $p<0.05$).

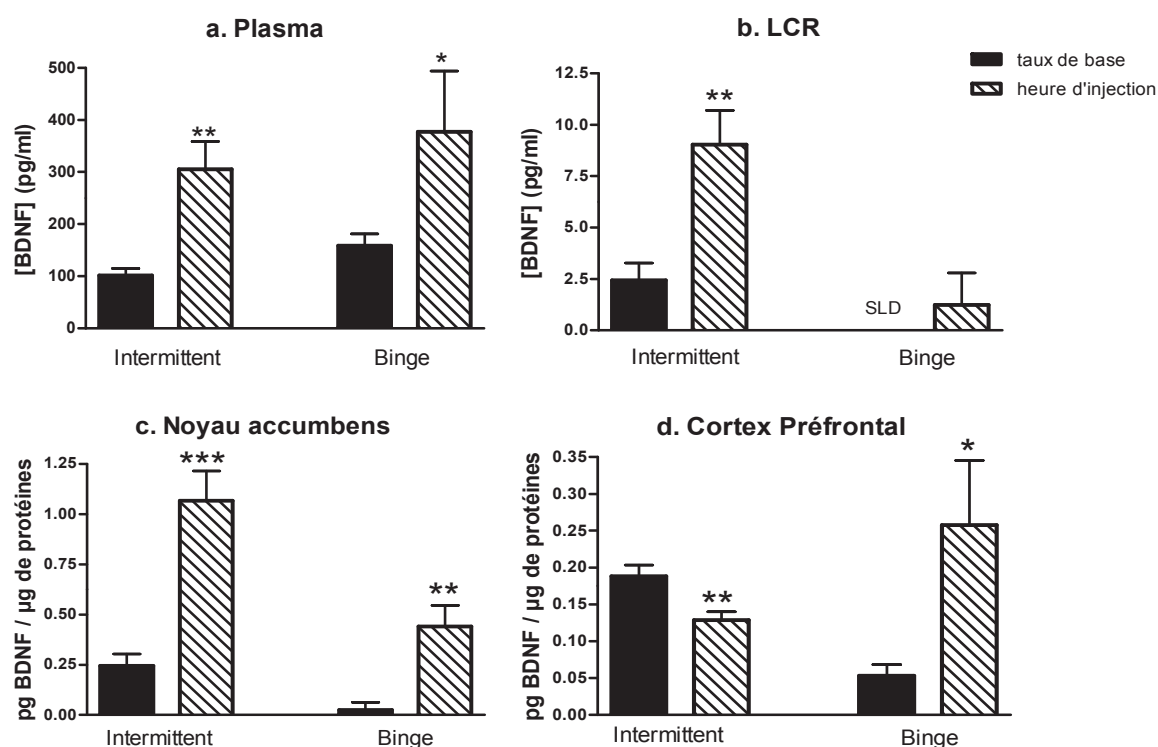


Figure 43. Mesure des taux de BDNF à l'heure d'injection, après 14 jours de sevrage

Mesure des taux de BDNF par ELISA dans le plasma, le liquide céphalorachidien (LCR), le noyau accumbens et le cortex préfrontal à partir de prélèvements réalisés après un jour de sevrage exactement à l'heure à laquelle les animaux avaient l'habitude de recevoir la cocaïne pendant les traitements (10 h pour les intermittents et 16 pour les binges). La comparaison des taux de base des animaux prétraités avec la cocaïne par rapport aux saline a été faite par comparaison des moyennes avec le test t de Student, $p < 0.05$ a été choisi comme seuil de significativité. Plasma : $IC_{(base)} n=10$, $IC_{(heure\ d'injection)} n=10$, $BC_{(base)} n=10$, $BC_{(heure\ d'injection)} n=10$; LCR : $IC_{(base)} n=6$, $IC_{(heure\ d'injection)} n=7$, $BC_{(base)} n=6$, $BC_{(heure\ d'injection)} n=10$; Noyau accumbens : $IC_{(base)} n=5$, $IC_{(heure\ d'injection)} n=5$, $BC_{(base)} n=8$, $BC_{(heure\ d'injection)} n=7$; cortex préfrontal : $IC_{(base)} n=6$, $IC_{(heure\ d'injection)} n=8$, $BC_{(base)} n=6$, $BC_{(heure\ d'injection)} n=5$. (Légende : ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

DISCUSSION – DEUXIEME PARTIE



Discussion des résultats

Ces travaux donnent lieu à une publication en cours de préparation :

S. Puig, F. Noble, N. Benturquia. *Different cocaine-induced central and peripheral variations of the Brain-Derived Neurotrophic Factor according to the pattern of administration.*

1. Modifications du BDNF basal

Nous avons analysé les conséquences d'administrations répétées de cocaïne selon nos deux profils d'administration sur les taux de BDNF, après un jour de sevrage et après un sevrage long. Cette étude nous a permis de mettre en évidence que les modifications des taux de base de BDNF dans plusieurs compartiments biologiques sont différentes selon le profil d'administration de cocaïne.

Pour les animaux traités selon le profil intermittent, le traitement a conduit à une **diminution** des taux de base de BDNF dans le plasma, le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le noyau accumbens mais nous n'avons pas observée de variations dans le cortex préfrontal. Suite à la période de 14 jours de sevrage, la diminution de BDNF dans le plasma et le LCR est plus forte alors que les taux de BDNF dans le noyau accumbens reviennent à la normale.

Après l'administration répétée de cocaïne selon le profil binge, une forte **augmentation** des taux de base de BDNF a été observée dans le plasma et dans le noyau accumbens et une diminution a été observée dans le LCR, sans modification dans le cortex préfrontal. Le sevrage prolongé suite à ce profil d'administration, a conduit à une forte diminution des taux de base de BDNF dans le LCR, le noyau accumbens mais aussi dans le cortex préfrontal alors qu'ils sont de retour à la normale dans le plasma (Tableau 15).

Ces résultats montrent que les taux de LCR basaux sont diminués suite aux deux profils d'administration, et ces diminutions sont encore plus fortes après les 14 jours de sevrage. Ceci n'avait encore jamais été mesuré et indique que cette variation commune aux deux profils d'administration de cocaïne pourrait marquer l'état de dépendance en général.

Cette étude montre également que le BDNF basal n'est pas modifié dans le cortex préfrontal, suite aux administrations répétées de cocaïne et qu'il faut attendre 14 jours de sevrage pour qu'une variation ait lieu dans cette structure, uniquement pour le profil binge.

Parmi les différentes variations observées pour les taux de base de BDNF, nos résultats montrent que les variations dans le plasma et le noyau accumbens se font dans le même sens. En effet, nous avons observé une diminution des taux de BDNF dans le plasma et le noyau accumbens pour le groupe

intermittent et une augmentation dans ces mêmes compartiments pour le groupe binge. Ceci met en évidence que le BDNF au niveau périphérique varierait de la même façon que dans la structure des terminaisons dopaminergiques mésolimbique. Le BDNF plasmatique pourrait donc refléter les adaptations dans le noyau accumbens induites par la prise répétée de cocaïne.

La diminution de BDNF basal dans le noyau accumbens pour le profil intermittent est cohérente avec la diminution de dopamine basale observée dans la première partie de cette thèse (Puig et al, 2012), pour ce profil d'administration. Il a également été démontré que l'injection d'anticorps anti-BDNF ou anti-TrkB dans le noyau accumbens pouvait diminuer l'augmentation de dopamine provoquée par l'injection de méthamphétamine (Narita et al, 2003). La diminution de BDNF pourrait donc induire une diminution de la libération de dopamine. Nous avons également observé pour ce profil une diminution de BDNF dans le plasma après un jour qui devient encore plus forte après le sevrage. Ceci est en accord avec Hilburn et collaborateurs qui ont observé une corrélation entre les taux de BDNF plasmatique et la durée de sevrage chez l'homme. Il existe encore peu d'études dans la littérature mesurant les conséquences d'une administration forcée de cocaïne sur les taux de BDNF. Dans le plasma, des études cliniques ont été réalisées chez des patients cocaïnomanes et montrent que le BDNF serait augmenté (D'sa et al, 2011, Hilburn et al, 2011) ce qui va à l'encontre des observations qui ont été faites pour le profil intermittent dans notre étude. Pour les variations dans le noyau accumbens nos résultats ne sont pas en accord avec d'autres études de la littérature qui avaient observé plutôt une augmentation de BDNF en conséquence à l'administration répétée de cocaïne dans le noyau accumbens, l'aire tegmentale et l'amygdale (Grimm et al, 2003, Graham et al, 2007, 2009). Néanmoins, ces observations sont faites suite à des protocoles d'autoadministration, dont les injections utilisent des doses très inférieures à des doses administrées en intrapéritonéale et délivrées avec une fréquence élevée. Ce sont donc des protocoles d'administration très différents des nôtres et les différences de résultats avec le profil intermittent viennent renforcer notre hypothèse selon laquelle les variations induites par la cocaïne sont différentes en fonction du profil d'administration. De plus, Graham et collaborateurs ont rapporté en 2009 que si la cocaïne est autoadministrée ou injectée de façon passive à des rats elle induit des modifications différentes des taux de BDNF dans le noyau accumbens et l'aire tegmentale ventrale.

Pour les animaux traités selon le profil binge, les variations de BDNF dans le plasma et dans le noyau accumbens, sont opposées à celles observées pour le profil intermittent. En effet, nous avons mis en évidence une forte augmentation des taux de base de BDNF dans le plasma après un jour de sevrage, qui ne persiste pas après 14 jours de sevrage. Ceci est associé à une augmentation du BDNF dans le noyau accumbens qui devient une diminution après le sevrage prolongé. L'augmentation de BDNF a

déjà été observée dans le plasma chez des patients cocaïnomanes (D'sa et al, 2011, Hilburn et al, 2011) et dans le noyau accumbens, chez le rat (Horger et al, 1998, Grimm et al, 2003, Graham et al, 2007), ces variations seraient donc en accord avec un état de dépendance. De plus, contrairement aux animaux du profil intermittent, l'effet d'un sevrage long a conduit à une forte diminution des taux de BDNF dans les structures cérébrales analysées. Cette modification importante montre que le sevrage a eu de fortes répercussions sur l'équilibre du BDNF dans le cerveau chez les animaux du profil binge. La diminution à la fois dans le cortex préfrontal et le noyau accumbens pourrait s'expliquer par le fait que le BDNF striatal provient majoritairement des neurones pyramidaux du cortex préfrontal par transport vésiculaire antérograde (Altar et al, 1997). La quantité de BDNF produite dans le cortex préfrontal influencerait donc la quantité de BDNF dans le noyau accumbens. Le BDNF serait également impliqué dans les processus de dépression et il est modifié dans des modèles animaux anxio-dépressifs, au niveau central et dans le plasma (Govindarajan et al, 2006, Groves, 2007, Luo et al, 2007). Nous pouvons donc penser que les différentes variations de BDNF dans le cerveau entre les deux profils d'administration résultent de l'effet de la cocaïne mais aussi de l'implication de voies de la dépression.

2. Modifications du BDNF lors de l'anticipation

Au cours de ce travail nous avons pu mettre en évidence que les taux de BDNF sont modifiés dans les différents compartiments biologiques analysés, de façon différente à l'heure habituelle d'injection de cocaïne, en comparaison avec les taux de base, sans intervention de l'expérimentateur.

Le profil d'administration intermittent a entraîné une **augmentation** des taux de BDNF à l'heure habituelle d'injection à la fois dans le plasma et le noyau accumbens, accompagnées d'une augmentation non significative dans le LCR. Après un sevrage prolongé, ces augmentations sont plus fortes et plus marquées et sont accompagnées d'une diminution des taux de BDNF dans le cortex préfrontal.

Pour le profil d'administration binge nous avons observé une **diminution** des taux de BDNF dans le plasma et le noyau accumbens à l'heure habituelle d'injection, 24 heures après la fin du traitement. Dans le LCR c'est une augmentation qui est observée pour ce profil et il n'y a pas de variation dans le cortex préfrontal. Après le sevrage prolongé, nous avons observé une augmentation simultanée de BDNF dans l'ensemble des compartiments biologiques analysés (Tableau 15).

Ces résultats montrent que des variations du BDNF à l'heure habituelle d'injection pourraient refléter les processus d'anticipation mis en évidence précédemment (Puig et al, 2012).

Dans le LCR la variation au moment de l'anticipation est commune aux différents profils de prise de cocaïne, comme pour les taux de base.

Pour les compartiments centraux et plasmatiques nous avons observé que les taux de BDNF réagissent spécifiquement et par des variations opposées à celles des taux de base, à l'anticipation des effets renforçants de la cocaïne à l'heure habituelle d'injection. L'ensemble des variations mesurées à l'heure habituelle d'injection de cocaïne montre que le BDNF serait impliqué dans les processus d'anticipation. La mise en évidence de ce processus avec la mesure de la dopamine extracellulaire et de la locomotion à l'heure habituelle d'injection a révélé une implication plus forte de ces deux paramètres pour le profil intermittent que pour le profil binge (Puig et al, 2012). Pour le BDNF, les deux profils d'administration ont entraîné des variations importantes de BDNF à l'heure habituelle d'injection dans l'ensemble des compartiments analysés et ce, de façon différente selon le profil d'administration. Ces variations spécifiques selon le profil d'administration mettent en évidence que les deux groupes d'animaux ont développé une anticipation des effets renforçants de la cocaïne mais que cela doit mettre en jeu des mécanismes différents.

Dans le cerveau, des variations de BDNF sont capables de réguler les comportements de l'addiction différemment selon la structure. En effet, dans le noyau accumbens, une injection de BDNF peut induire une augmentation de recherche de drogue (Graham et al, 2007) et une délétion conditionnelle (par *knockdown*) de BDNF dans cette même structure induit une diminution des effets renforçants de la cocaïne (Graham et al, 2009). En revanche, il a été démontré qu'une injection de BDNF dans le cortex préfrontal pouvait diminuer les comportements de recherche de drogue (Berglind et al, 2007).

Les variations de BDNF observées dans notre étude pour chaque groupe d'animaux mettent en évidence que les processus de l'addiction et de l'anticipation sont différents selon le profil d'administration. Cela pourrait expliquer le fait que les deux profils d'administration n'ont pas mis en jeu le système dopaminergique de la même façon lors de l'anticipation.

Un autre point intéressant dans nos résultats est la variation similaire des taux de BDNF à l'heure habituelle d'injection dans le plasma et le noyau accumbens au sein d'un même profil d'administration, ce qui a aussi été observé pour les taux de base. Ceci semble confirmer que les taux de BDNF plasmatique varient de la même façon que les taux de BDNF dans le noyau accumbens et c'est en accord avec le fait qu'il y aurait un système de régulation qui permettrait des variations communes entre le BDNF central et périphérique (Karege et al, 2002). Par ailleurs, après un jour de sevrage, chaque profil d'administration de cocaïne a développé une variation spécifique de BDNF dans le plasma et le noyau accumbens (augmentation pour les animaux intermittents et diminution pour les animaux binge).

Nous mettons également en évidence que bien que nous ayons observé des différences de variation entre les deux profils d'administration après le sevrage court, les variations après un sevrage long lors de l'anticipation se font toutes dans le sens de l'augmentation pour les deux profils d'administration dans le plasma, le LCR et le noyau accumbens. Ces variations pourraient donc marquer l'anticipation de la prise de cocaïne après un sevrage prolongé. Le BDNF plasmatique pourrait donc être un marqueur de l'anticipation des effets renforçants de la cocaïne.

L'ensemble de ces résultats indiquent que la prise de cocaïne à une heure précise entraîne une modification de l'expression de BDNF, exactement à l'heure habituelle d'injection, comme ce qui a été observé pour la dopamine et la locomotion dans l'étude précédente. Le BDNF et la dopamine semblent donc impliqués dans l'anticipation des effets renforçants de la cocaïne à l'heure habituelle d'injection. Il est possible que, comme ce qui a été discuté pour la dopamine, la cocaïne affecte l'expression du BDNF par la perturbation de la régulation de l'expression de gènes circadiens (Abarca et al, 2002). En effet, l'expression du BDNF est régulée par des protéines impliquées dans le rythme circadien comme Rack1 (Neasta et al, 2011) et cette protéine d'échafaudage régule également l'activité transcriptionnelle de gènes circadiens canoniques comme Clock ou Bmal1. De plus, il a été rapporté que Rack1 pouvait être perturbé après la consommation de substances psychoactives (Adams et al, 2011).

Le BDNF et la dopamine sont deux constituants de la neurotransmission du système nerveux central et plus particulièrement du système de la récompense. Ils exercent des régulations réciproques l'un sur l'autre. En effet, le BDNF étant le facteur neurotrophique du système dopaminergique central, ses variations ont une influence sur l'activité des neurones dopaminergiques et sur les comportements de la dépendance qui ont été associés au système dopaminergique comme la sensibilisation locomotrice et la préférence de place conditionnée (Horger et al, 1999, Hall et al, 2003, Narita et al, 2003). De plus, le BDNF est une protéine dont l'expression est régulée par des facteurs de transcription sous le contrôle de l'activité de l'adénylate cyclase (Adams et al, 2011) qui font partie de la cascade d'activation des récepteurs dopaminergiques. Ces deux molécules doivent donc être impliquées dans des cascades de régulation et de mise en place de l'anticipation des effets renforçants de la prise de drogue.

Tableau 15. Récapitulatif du sens et de l'intensité des variations observées pour les taux de BDNF à la suite des 14 jours d'administrations répétées de cocaïne.

sevrage	Structure	Intermittent		Binge	
		taux de base	heure d'injection	taux de base	heure d'injection
1 jour	PLASMA	↓	↑	↑↑↑	↓↓↓
	LCR	↓	« ↑ »	↓	↑
	NAC	↓↓	↑	↑	↓
	CPF	=	=	=	=
14 jours	PLASMA	↓↓↓	↑	=	↑
	LCR	↓↓	↑↑	↘	↗
	NAC	=	↑↑↑	↓↓	↑↑
	CPF	=	↓↓	↓↓	↑

Légende : flèche rouge : diminution, flèche bleue : augmentation, ↑: p<0.05, ↑↑: p<0.01, ↑↑↑p<0.001, « ↑ »: variation non significativement différente des animaux traités avec du sérum physiologique, ↗, ↘ : comparaison de valeurs par rapport à un niveau de base qui était en dessous de la limite de détection.

Perspectives

Nous avons montré dans cette étude que le BDNF était modifié au niveau central et périphérique de façon différente selon le profil de consommation. De plus nous avons montré que des variations à l'heure habituelle d'injection, reflètent les variations comportementales et neurochimiques observées lors de l'anticipation des effets renforçants de la drogue.

Une des perspectives de cette étude serait de compléter les effectifs pour chaque profil d'administration et chaque prélèvement. Cela permettrait sans doute d'arriver à montrer des corrélations significatives entre les variations des différents compartiments biologiques. Nous pourrions ainsi déterminer le caractère biomarqueur du BDNF pour l'addiction et cela serait utile lors de la prise en charge thérapeutique des patients afin de définir des traitements appropriés selon chaque profil de consommation. Une étude clinique est actuellement en cours, et elle se fait en collaboration avec l'équipe de cliniciens de notre unité (Dr Jean-Pierre Lépine et Dr Florence Vorspan). Celle-ci consiste à collecter des échantillons plasmatiques de patients cocaïnomanes. Elle s'accompagne d'un questionnaire permettant de déterminer le profil de consommation de chaque patient. Le but étant de déterminer différents profils de consommation chez l'homme et de faire une étude comparative avec les données récoltées chez le rat.

Grâce au biomarqueur plasmatique précédemment déterminé, des profils de modifications neurochimiques différents induits par des types de consommation distincts pourront être dégagés.

Tout ceci dans le but de pouvoir adapter prochainement le traitement pharmacologique pour chaque patient en fonction du profil de consommation.

Nous avons vu que le BDNF et la dopamine sont impliqués dans les processus d'anticipation. Cependant nous ne sommes pas en mesure de savoir comment sont reliées les modifications de chacune de ces protéines. Il serait intéressant de savoir si c'est le BDNF qui est responsable de la mise en place de l'anticipation dopaminergique ou bien si ses variations à l'heure habituelle d'injection, sont une conséquence des modifications dopaminergiques.

Afin de savoir si le BDNF joue un rôle en amont de l'anticipation dopaminergique, la mise en place de ce processus pourrait être étudiée chez des rats hétérozygotes pour le BDNF, dont la souche Sprague Dawley est la même que celle que nous avons utilisé dans cette étude. Si chez ces animaux l'anticipation dopaminergique et/ou comportementale n'est pas observée ou bien est diminuée, cela montrerait que le BDNF est impliqué dans les processus de mise en place de l'anticipation qui induisent l'anticipation dopaminergique et/ou comportementale.

Pour étudier l'implication du BDNF en aval de la dopamine dans les processus d'anticipation, nous pourrions mesurer les modifications de facteurs de transcription qui régulent l'expression du BDNF,

qui sont sous l'influence de l'activation des récepteurs dopaminergiques, comme Rack1. Cette protéine d'échafaudage est également intéressante pour l'étude des processus d'anticipation car elle est impliquée dans la régulation de l'expression de gènes du rythme circadien (Adams et al, 2011, Neasta et al, 2011). Nous pourrions étudier les modifications de Rack1 à l'heure habituelle d'injection de cocaïne. Il est possible que la cocaïne perturbe son expression lors des injections et conduise aux modifications de BDNF à l'heure précise de l'injection.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abarca, C., U. Albrecht, et al. (2002). "Cocaine sensitization and reward are under the influence of circadian genes and rhythm." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(13): 9026-9030.
- Aicardi, G., E. Argilli, et al. (2004). "Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(44): 15788-15792.
- Altar, C. A., N. Cai, et al. (1997). "Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain." *Nature* **389**(6653): 856-860.
- Altar, C. A., M. Fritsche, et al. (1998). "Cell body injections of brain-derived neurotrophic factor increase forebrain dopamine release and serotonin metabolism determined with in vivo microdialysis." *Adv Pharmacol* **42**: 915-921.
- Anderson, S. M. and R. C. Pierce (2005). "Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: implications for reinforcement and reinstatement." *Pharmacol Ther* **106**(3): 389-403.
- Autry, A. E. and L. M. Monteggia (2012). "Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders." *Pharmacol Rev* **64**(2): 238-258.

B

- B Baker, D. A., K. McFarland, et al. (2003). "Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse." *Nat Neurosci* **6**(7): 743-749.
- Barde, Y. A., D. Edgar, et al. (1982). "Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain." *Embo J* **1**(5): 549-553.
- Basar, K., T. Sesia, et al. (2010). "Nucleus accumbens and impulsivity." *Prog Neurobiol* **92**(4): 533-557.
- Bass, C. E., H. T. Jansen, et al. (2010). "Free-running rhythms of cocaine self-administration in rats held under constant lighting conditions." *Chronobiol Int* **27**(3): 535-548.
- Bell, K., P. Duffy, et al. (2000). "Context-specific enhancement of glutamate transmission by cocaine." *Neuropsychopharmacology* **23**(3): 335-344.
- Berendse, H. W., Y. Galis-de Graaf, et al. (1992). "Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat." *J Comp Neurol* **316**(3): 314-347.
- Berglind, W. J., R. E. See, et al. (2007). "A BDNF injection into the medial prefrontal cortex suppresses cocaine seeking in rats." *Eur J Neurosci* **26**(3): 757-766.
- Berglind, W. J., T. W. Whitfield, Jr., et al. (2009). "A single intra-PFC injection of BDNF prevents cocaine-induced alterations in extracellular glutamate within the nucleus accumbens." *J Neurosci* **29**(12): 3715-3719.
- Beurrier, C. and R. C. Malenka (2002). "Enhanced inhibition of synaptic transmission by dopamine in the nucleus accumbens during behavioral sensitization to cocaine." *J Neurosci* **22**(14): 5817-5822.
- Bowers, M. S., B. T. Chen, et al. (2010). "AMPA receptor synaptic plasticity induced by psychostimulants: the past, present, and therapeutic future." *Neuron* **67**(1): 11-24.
- Brog, J. S., A. Salyapongse, et al. (1993). "The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold." *J Comp Neurol* **338**(2): 255-278.
- Brown, E. E. and H. C. Fibiger (1992a). "Cocaine-induced conditioned locomotion: absence of associated increases in dopamine release." *Neuroscience* **48**(3): 621-629.
- Brown, E. E., G. S. Robertson, et al. (1992b). "Evidence for conditional neuronal activation following exposure to a cocaine-paired environment: role of forebrain limbic structures." *J Neurosci* **12**(10): 4112-4121.
- Burechailo, L. and M. T. Martin-Iverson (1996). "Behavioral sensitization to cocaine, but not cocaine-conditioned behavior, is associated with increased dopamine occupation of its receptors in the nucleus accumbens." *Behav Neurosci* **110**(6): 1388-1396.

Burger, L. Y. and M. T. Martin-Iverson (1994). "Increased occupation of D1 and D2 dopamine receptors accompanies cocaine-induced behavioral sensitization." Brain Res **639**(2): 228-232.

C

Cadoni, C. and G. Di Chiara (1999). "Reciprocal changes in dopamine responsiveness in the nucleus accumbens shell and core and in the dorsal caudate-putamen in rats sensitized to morphine." Neuroscience **90**(2): 447-455.

Carr, D. B. and S. R. Sesack (2000). "Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons." J Neurosci **20**(10): 3864-3873.

Castaneda, T. R., B. M. de Prado, et al. (2004). "Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light." J Pineal Res **36**(3): 177-185.

Centonze, D., P. Gubellini, et al. (2004). "Differential contribution of dopamine D2S and D2L receptors in the modulation of glutamate and GABA transmission in the striatum." Neuroscience **129**(1): 157-166.

Cerruti, C., N. S. Pilotte, et al. (1994). "Reduction in dopamine transporter mRNA after cessation of repeated cocaine administration." Brain Res Mol Brain Res **22**(1-4): 132-138.

Choi, K. H., K. Whisler, et al. (2006). "Antisense-induced reduction in nucleus accumbens cyclic AMP response element binding protein attenuates cocaine reinforcement." Neuroscience **137**(2): 373-383.

Christopher Pierce, R., C. P. O'Brien, et al. (2012). "Rational development of addiction pharmacotherapies: successes, failures, and prospects." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(6): a012880.

Chu, C. L., C. K. Liang, et al. (2011). "Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in institutionalized elderly with depressive disorder." J Am Med Dir Assoc **13**(5): 434-437.

Cornish, J. L., P. Duffy, et al. (1999). "A role for nucleus accumbens glutamate transmission in the relapse to cocaine-seeking behavior." Neuroscience **93**(4): 1359-1367.

Cornish, J. L. and P. W. Kalivas (2000). "Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction." J Neurosci **20**(15): RC89.

Cornish, J. L. and P. W. Kalivas (2001). "Cocaine sensitization and craving: differing roles for dopamine and glutamate in the nucleus accumbens." J Addict Dis **20**(3): 43-54.

Cornish, J. L. and P. W. Kalivas (2001). "Repeated cocaine administration into the rat ventral tegmental area produces behavioral sensitization to a systemic cocaine challenge." Behav Brain Res **126**(1-2): 205-209.

Corominas, M., C. Roncero, et al. (2007). "Brain-derived neurotrophic factor and its intracellular signaling pathways in cocaine addiction." Neuropsychobiology **55**(1): 2-13.

D

D'Sa, C., H. C. Fox, et al. (2011). "Increased serum brain-derived neurotrophic factor is predictive of cocaine relapse outcomes: a prospective study." Biol Psychiatry **70**(8): 706-711.

Davidson, A. J., O. Tataroglu, et al. (2005). "Circadian effects of timed meals (and other rewards)." Methods Enzymol **393**: 509-523.

Daws, L. C., P. D. Callaghan, et al. (2002). "Cocaine increases dopamine uptake and cell surface expression of dopamine transporters." Biochem Biophys Res Commun **290**(5): 1545-1550.

de Lima, M. S., B. G. de Oliveira Soares, et al. (2002). "Pharmacological treatment of cocaine dependence: a systematic review." Addiction **97**(8): 931-949.

de Oliveira Cito Mdo, C., F. C. da Silva, et al. (2012). "Reversal of cocaine withdrawal-induced anxiety by ondansetron, buspirone and propranolol." Behav Brain Res **231**(1): 116-123.

- Di Chiara, G. and A. Imperato (1988). "Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5274-5278.
- DSM-IV-TR. Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux. American Psychiatric association. Editions Masson (2000).
- Duvauchelle, C. L., A. Ikegami, et al. (2000a). "Effects of cocaine context on NAcc dopamine and behavioral activity after repeated intravenous cocaine administration." Brain Res **862**(1-2): 49-58.
- Duvauchelle, C. L., A. Ikegami, et al. (2000b). "Conditioned increases in behavioral activity and accumbens dopamine levels produced by intravenous cocaine." Behav Neurosci **114**(6): 1156-1166.

E

- Elfving, B., P. H. Plougmann, et al. (2010). "Inverse correlation of brain and blood BDNF levels in a genetic rat model of depression." Int J Neuropsychopharmacol **13**(5): 563-572.
- Everitt, B. J., K. A. Morris, et al. (1991). "The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes." Neuroscience **42**(1): 1-18.

F

- Filip, M., A. Faron-Gorecka, et al. (2006). "Alterations in BDNF and trkB mRNAs following acute or sensitizing cocaine treatments and withdrawal." Brain Res **1071**(1): 218-225.
- Fitzgerald, L. W., J. Ortiz, et al. (1996). "Drugs of abuse and stress increase the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: common adaptations among cross-sensitizing agents." J Neurosci **16**(1): 274-282.
- Floresco, S. B., C. D. Blaha, et al. (2001). "Modulation of hippocampal and amygdalar-evoked activity of nucleus accumbens neurons by dopamine: cellular mechanisms of input selection." J Neurosci **21**(8): 2851-2860.
- Fontana, D. J., R. M. Post, et al. (1993). "Conditioned increases in mesolimbic dopamine overflow by stimuli associated with cocaine." Brain Res **629**(1): 31-39.
- Fujimura, H., C. A. Altar, et al. (2002). "Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation." Thromb Haemost **87**(4): 728-734.

G

- Geisler, S. and D. S. Zahm (2005). "Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions." J Comp Neurol **490**(3): 270-294.
- Giorgetti, M., G. Hotsenpiller, et al. (2001). "Amphetamine-induced plasticity of AMPA receptors in the ventral tegmental area: effects on extracellular levels of dopamine and glutamate in freely moving rats." J Neurosci **21**(16): 6362-6369.
- Giros, B., P. Sokoloff, et al. (1989). "Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms." Nature **342**(6252): 923-926.
- Grace, A. A. and B. S. Bunney (1985). "Opposing effects of striatonigral feedback pathways on midbrain dopamine cell activity." Brain Res **333**(2): 271-284.
- Grace, A. A. and S. P. Onn (1989). "Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro." J Neurosci **9**(10): 3463-3481.
- Graham, D. L., S. Edwards, et al. (2007). "Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse." Nat Neurosci **10**(8): 1029-1037.

- Grimm, J. W., L. Lu, et al. (2003). "Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving." *J Neurosci* **23**(3): 742-747.
- Groenewegen, H. J. and M. Trimble (2007). "The ventral striatum as an interface between the limbic and motor systems." *CNS Spectr* **12**(12): 887-892.
- Guiramand, J., J. P. Montmayeur, et al. (1995). "Alternative splicing of the dopamine D2 receptor directs specificity of coupling to G-proteins." *J Biol Chem* **270**(13): 7354-7358.

H

- Hall, F. S., J. Drgonova, et al. (2003). "Reduced behavioral effects of cocaine in heterozygous brain-derived neurotrophic factor (BDNF) knockout mice." *Neuropsychopharmacology* **28**(8): 1485-1490.
- Hatzigiakoumis, D. S., G. Martinotti, et al. (2011). "Anhedonia and substance dependence: clinical correlates and treatment options." *Front Psychiatry* **2**: 10.
- Heidbreder, C. A. and T. S. Shippenberg (1994). "U-69593 prevents cocaine sensitization by normalizing basal accumbens dopamine." *Neuroreport* **5**(14): 1797-1800.
- Heidbreder, C. A., A. C. Thompson, et al. (1996). "Role of extracellular dopamine in the initiation and long-term expression of behavioral sensitization to cocaine." *J Pharmacol Exp Ther* **278**(2): 490-502.
- Heimer, L., D. S. Zahm, et al. (1991). "Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat." *Neuroscience* **41**(1): 89-125.
- Henry, D. J., X. T. Hu, et al. (1998). "Adaptations in the mesoaccumbens dopamine system resulting from repeated administration of dopamine D1 and D2 receptor-selective agonists: relevance to cocaine sensitization." *Psychopharmacology (Berl)* **140**(2): 233-242.
- Henry, D. J. and F. J. White (1991). "Repeated cocaine administration causes persistent enhancement of D1 dopamine receptor sensitivity within the rat nucleus accumbens." *J Pharmacol Exp Ther* **258**(3): 882-890.
- Henry, D. J. and F. J. White (1995). "The persistence of behavioral sensitization to cocaine parallels enhanced inhibition of nucleus accumbens neurons." *J Neurosci* **15**(9): 6287-6299.
- Herges, S. and D. A. Taylor (1998). "Involvement of serotonin in the modulation of cocaine-induced locomotor activity in the rat." *Pharmacol Biochem Behav* **59**(3): 595-611.
- Herges, S. and D. A. Taylor (1999). "Modulation of cocaine-induced locomotor activity, rears and head bobs by application of WAY100635 into the dorsal and median raphe nuclei of the rat." *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **360**(2): 129-134.
- Herges, S. and D. A. Taylor (2000). "Involvement of 5-HT(3) receptors in the nucleus accumbens in the potentiation of cocaine-induced behaviours in the rat." *Br J Pharmacol* **131**(7): 1294-1302.
- Horger, B. A., C. A. Iyasere, et al. (1999). "Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor." *J Neurosci* **19**(10): 4110-4122.
- Hotsenpiller, G., M. Giorgetti, et al. (2001). "Alterations in behaviour and glutamate transmission following presentation of stimuli previously associated with cocaine exposure." *Eur J Neurosci* **14**(11): 1843-1855.

I

- Ikemoto, S. (2007). "Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex." *Brain Res Rev* **56**(1): 27-78.
- Imperato, A., A. Mele, et al. (1992b). "Chronic cocaine alters limbic extracellular dopamine. Neurochemical basis for addiction." *Eur J Pharmacol* **212**(2-3): 299-300.
- Imperato, A., M. C. Obinu, et al. (1992a). "Cocaine releases limbic acetylcholine through endogenous dopamine action on D1 receptors." *Eur J Pharmacol* **229**(2-3): 265-267.

J

Jansen, H. T., A. Sergeeva, et al. (2012). "Circadian discrimination of reward: evidence for simultaneous yet separable food- and drug-entrained rhythms in the rat." Chronobiol Int **29**(4): 454-468.

K

- Kalivas, P. W. (2009). "The glutamate homeostasis hypothesis of addiction." Nat Rev Neurosci **10**(8): 561-572.
- Kalivas, P. W. and P. Duffy (1993a). "Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. I. Dopamine axon terminals." J Neurosci **13**(1): 266-275.
- Kalivas, P. W. and P. Duffy (1993b). "Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. II. Dopamine perikarya." J Neurosci **13**(1): 276-284.
- Kalivas, P. W. and P. Duffy (1995). "D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area." J Neurosci **15**(7 Pt 2): 5379-5388.
- Kalivas, P. W. and P. Duffy (1998). "Repeated cocaine administration alters extracellular glutamate in the ventral tegmental area." J Neurochem **70**(4): 1497-1502.
- Kalivas, P. W., P. Duffy, et al. (1988). "Behavioral and neurochemical effects of acute and daily cocaine administration in rats." J Pharmacol Exp Ther **245**(2): 485-492.
- Kalivas, P. W., R. T. Lalumiere, et al. (2009). "Glutamate transmission in addiction." Neuropharmacology **56 Suppl 1**: 169-173.
- Kalivas, P. W. and J. Stewart (1991). "Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity." Brain Res Brain Res Rev **16**(3): 223-244.
- Kalivas, P. W., C. D. Striplin, et al. (1992). "Cellular mechanisms of behavioral sensitization to drugs of abuse." Ann N Y Acad Sci **654**: 128-135.
- Karege, F., M. Schwald, et al. (2002). "Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets." Neurosci Lett **328**(3): 261-264.
- Karler, R., L. D. Calder, et al. (1994). "Cocaine behavioral sensitization and the excitatory amino acids." Psychopharmacology (Berl) **115**(3): 305-310.
- Karler, R., L. D. Calder, et al. (1998). "The role of dopamine in the mouse frontal cortex: a new hypothesis of behavioral sensitization to amphetamine and cocaine." Pharmacol Biochem Behav **61**(4): 435-443.
- Kelley, A. E. and C. A. Schiltz (2004). "Accessories to addiction: G protein regulators play a key role in cocaine seeking and neuroplasticity." Neuron **42**(2): 181-183.
- Kelly, P. H., P. W. Seviour, et al. (1975). "Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum." Brain Res **94**(3): 507-522.
- King, G. R., C. Joyner, et al. (1992). "Intermittent and continuous cocaine administration: residual behavioral states during withdrawal." Pharmacol Biochem Behav **43**(1): 243-248.
- Klein, R., V. Nanduri, et al. (1991). "The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3." Cell **66**(2): 395-403.
- Kleven, M. S., B. D. Perry, et al. (1990). "Effects of repeated injections of cocaine on D1 and D2 dopamine receptors in rat brain." Brain Res **532**(1-2): 265-270.
- Kokaia, Z., J. Bengzon, et al. (1993). "Coexpression of neurotrophins and their receptors in neurons of the central nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6711-6715.
- Kuhar, M. J., M. C. Ritz, et al. (1991). "The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine." Trends Neurosci **14**(7): 299-302.

Kunko, P. M., D. French, et al. (1998). "Alterations in locomotor activity during chronic cocaine administration: effect on dopamine receptors and interaction with opioids." J Pharmacol Exp Ther **285**(1): 277-284.

L

- Lammel, S., A. Hetzel, et al. (2008). "Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system." Neuron **57**(5): 760-773.
- Lauterborn, J. C., S. Rivera, et al. (1996). "Differential effects of protein synthesis inhibition on the activity-dependent expression of BDNF transcripts: evidence for immediate-early gene responses from specific promoters." J Neurosci **16**(23): 7428-7436.
- Le Foll, B., J. Diaz, et al. (2005). "A single cocaine exposure increases BDNF and D3 receptor expression: implications for drug-conditioning." Neuroreport **16**(2): 175-178.
- Le Foll, B., H. Frances, et al. (2002). "Role of the dopamine D3 receptor in reactivity to cocaine-associated cues in mice." Eur J Neurosci **15**(12): 2016-2026.
- Le Marec, T., C. Marie-Claire, et al. (2011). "Chronic and intermittent morphine treatment differently regulates opioid and dopamine systems: a role in locomotor sensitization." Psychopharmacology (Berl) **216**(2): 297-303.
- Li, Y., F. J. White, et al. (2000). "Pharmacological reversal of behavioral and cellular indices of cocaine sensitization in the rat." Psychopharmacology (Berl) **151**(2-3): 175-183.
- Lima, M. S., A. A. Reisser, et al. (2003). "Antidepressants for cocaine dependence." Cochrane Database Syst Rev(2): CD002950.
- Lu, B. (2003). "BDNF and activity-dependent synaptic modulation." Learn Mem **10**(2): 86-98.
- Lu, L., J. Dempsey, et al. (2004). "A single injection of brain-derived neurotrophic factor into the ventral tegmental area induces long-lasting potentiation of cocaine seeking after withdrawal." J Neurosci **24**(7): 1604-1611.
- Lu, L., J. W. Grimm, et al. (2004). "Incubation of cocaine craving after withdrawal: a review of preclinical data." Neuropharmacology **47 Suppl 1**: 214-226.

M

- Maisonneuve, I. M., A. Ho, et al. (1995). "Chronic administration of a cocaine "binge" alters basal extracellular levels in male rats: an in vivo microdialysis study." J Pharmacol Exp Ther **272**(2): 652-657.
- Mamounas, L. A., C. A. Altar, et al. (2000). "BDNF promotes the regenerative sprouting, but not survival, of injured serotonergic axons in the adult rat brain." J Neurosci **20**(2): 771-782.
- Matsumoto, T., S. Rauskolb, et al. (2008). "Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF." Nat Neurosci **11**(2): 131-133.
- Mayfield, R. D., G. Larson, et al. (1992). "Cocaine-induced behavioral sensitization and D1 dopamine receptor function in rat nucleus accumbens and striatum." Brain Res **573**(2): 331-335.
- McCreary, A. C. and C. A. Marsden (1993). "Cocaine-induced behaviour: dopamine D1 receptor antagonism by SCH 23390 prevents expression of conditioned sensitisation following repeated administration of cocaine." Neuropharmacology **32**(4): 387-391.
- McFarland, K., C. C. Lapish, et al. (2003). "Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior." J Neurosci **23**(8): 3531-3537.
- McGinty, J. F. and J. E. Mendelson (2011). "Is brain-derived neurotrophic factor a selective biomarker that predicts cocaine relapse outcomes?" Biol Psychiatry **70**(8): 700-701.
- McGinty, J. F., T. W. Whitfield, Jr., et al. (2011). "Brain-derived neurotrophic factor and cocaine addiction." Brain Res **1314**: 183-193.
- Mena-Segovia, J., P. Winn, et al. (2008). "Cholinergic modulation of midbrain dopaminergic systems." Brain Res Rev **58**(2): 265-271.

- Mendelson, J. H. and N. K. Mello (1996). "Management of cocaine abuse and dependence." N Engl J Med **334**(15): 965-972.
- Meredith, G. E. (1999). "The synaptic framework for chemical signaling in nucleus accumbens." Ann N Y Acad Sci **877**: 140-156.
- Miguens, M., J. A. Crespo, et al. (2008). "Differential cocaine-induced modulation of glutamate and dopamine transporters after contingent and non-contingent administration." Neuropharmacology **55**(5): 771-779.
- Miguens, M., N. Del Olmo, et al. (2008). "Glutamate and aspartate levels in the nucleus accumbens during cocaine self-administration and extinction: a time course microdialysis study." Psychopharmacology (Berl) **196**(2): 303-313.
- Milner, P. M. (1991). "Brain-stimulation reward: a review." Can J Psychol **45**(1): 1-36.
- Missale, C., L. Castelletti, et al. (1985). "Dopamine uptake is differentially regulated in rat striatum and nucleus accumbens." J Neurochem **45**(1): 51-56.
- Mufson, E. J., J. S. Kroin, et al. (1994). "Intrastriatal injections of brain-derived neurotrophic factor: retrograde transport and colocalization with dopamine containing substantia nigra neurons in rat." Exp Neurol **129**(1): 15-26.

N

- Nair-Roberts, R. G., S. D. Chatelain-Badie, et al. (2008). "Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat." Neuroscience **152**(4): 1024-1031.
- Nakahashi, T., H. Fujimura, et al. (2000). "Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor." FEBS Lett **470**(2): 113-117.
- Narita, M., K. Aoki, et al. (2003). "Implication of brain-derived neurotrophic factor in the release of dopamine and dopamine-related behaviors induced by methamphetamine." Neuroscience **119**(3): 767-775.
- Nestler, E. J., R. Z. Terwilliger, et al. (1990). "Chronic cocaine treatment decreases levels of the G protein subunits Gi alpha and Go alpha in discrete regions of rat brain." J Neurochem **55**(3): 1079-1082.
- Ng, J. P., G. W. Hubert, et al. (1991). "Increased stimulated release and uptake of dopamine in nucleus accumbens after repeated cocaine administration as measured by in vivo voltammetry." J Neurochem **56**(5): 1485-1492.
- Noble, F. (2008). "[Current preclinical knowledge of the neurobiology of cocaine]." Presse Med **37**(12): 1767-1772.
- Noto, C. S., A. Gadelha, et al. (2011). "Association of biomarkers and depressive symptoms in schizophrenia." Neurosci Lett **505**(3): 282-285.
- Numan, S. and K. B. Seroogy (1999). "Expression of trkB and trkC mRNAs by adult midbrain dopamine neurons: a double-label in situ hybridization study." J Comp Neurol **403**(3): 295-308.

O

- Olds, M. E. and J. L. Fobes (1981). "The central basis of motivation: intracranial self-stimulation studies." Annu Rev Psychol **32**: 523-574.
- Opazo, P., A. M. Watabe, et al. (2003). "Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the induction of long-term potentiation through extracellular signal-related kinase-independent mechanisms." J Neurosci **23**(9): 3679-3688.

P

- Pan, W., W. A. Banks, et al. (1998). "Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier." *Neuropharmacology* **37**(12): 1553-1561.
- Pang, P. T. and B. Lu (2004). "Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF." *Ageing Res Rev* **3**(4): 407-430.
- Pang, P. T., H. K. Teng, et al. (2004). "Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity." *Science* **306**(5695): 487-491.
- Parsons, L. H., A. D. Smith, et al. (1991). "Basal extracellular dopamine is decreased in the rat nucleus accumbens during abstinence from chronic cocaine." *Synapse* **9**(1): 60-65.
- Paxinos G. and Watson C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Fourth Edition, Academic Press.
- Peng, X. Q., Z. X. Xi, et al. (2010). "Is slow-onset long-acting monoamine transport blockade to cocaine as methadone is to heroin? Implication for anti-addiction medications." *Neuropsychopharmacology* **35**(13): 2564-2578.
- Peris, J., S. J. Boyson, et al. (1990). "Persistence of neurochemical changes in dopamine systems after repeated cocaine administration." *J Pharmacol Exp Ther* **253**(1): 38-44.
- Pierce, R. C., K. Bell, et al. (1996). "Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization." *J Neurosci* **16**(4): 1550-1560.
- Pierce, R. C., A. F. Pierce-Bancroft, et al. (1999). "Neurotrophin-3 contributes to the initiation of behavioral sensitization to cocaine by activating the Ras/Mitogen-activated protein kinase signal transduction cascade." *J Neurosci* **19**(19): 8685-8695.
- Pilotte, N. S., L. G. Sharpe, et al. (1994). "Withdrawal of repeated intravenous injections of cocaine persistently reduces binding to dopamine transporters in the nucleus accumbens of Lewis rats." *J Pharmacol Exp Ther* **269**(3): 963-969.
- Pilotte, N. S., L. G. Sharpe, et al. (1996). "Cocaine withdrawal reduces dopamine transporter binding in the shell of the nucleus accumbens." *Synapse* **22**(1): 87-92.
- Pliego-Rivero, F. B., N. Bayatti, et al. (1997). "Brain-derived neurotrophic factor in human platelets." *Biochem Pharmacol* **54**(1): 207-209.
- Poduslo, J. F. and G. L. Curran (1996). "Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF." *Brain Res Mol Brain Res* **36**(2): 280-286.
- Pontieri, F. E., G. Tanda, et al. (1995). "Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(26): 12304-12308.
- Pu, L., Q. S. Liu, et al. (2006). "BDNF-dependent synaptic sensitization in midbrain dopamine neurons after cocaine withdrawal." *Nat Neurosci* **9**(5): 605-607.

R

- Radka, S. F., P. A. Holst, et al. (1996). "Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay." *Brain Res* **709**(1): 122-301.
- Reid, M. S. and S. P. Berger (1996). "Evidence for sensitization of cocaine-induced nucleus accumbens glutamate release." *Neuroreport* **7**(7): 1325-1329.
- Reid, M. S., K. Hsu, Jr., et al. (1997). "Cocaine and amphetamine preferentially stimulate glutamate release in the limbic system: studies on the involvement of dopamine." *Synapse* **27**(2): 95-105.
- Reith, M. E., M. Benuck, et al. (1987). "Cocaine disposition in the brain after continuous or intermittent treatment and locomotor stimulation in mice." *J Pharmacol Exp Ther* **243**(1): 281-287.

- Robbins, T. W., K. D. Ersche, et al. (2008). "Drug addiction and the memory systems of the brain." Ann N Y Acad Sci **1141**: 1-21.
- Robertson, M. W., C. A. Leslie, et al. (1991). "Apparent synaptic dopamine deficiency induced by withdrawal from chronic cocaine treatment." Brain Res **538**(2): 337-339.
- Rossetti, Z. L., Y. Hmaidan, et al. (1992a). "Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats." Eur J Pharmacol **221**(2-3): 227-234.
- Rossetti, Z. L., F. Melis, et al. (1992b). "Dramatic depletion of mesolimbic extracellular dopamine after withdrawal from morphine, alcohol or cocaine: a common neurochemical substrate for drug dependence." Ann N Y Acad Sci **654**: 513-516.
- Rowley, H. L., K. F. Martin, et al. (1995). "Determination of in vivo amino acid neurotransmitters by high-performance liquid chromatography with o-phthalaldehyde-sulphite derivatisation." J Neurosci Methods **57**(1): 93-99.

S

- Salomon, L., C. Lanteri, et al. (2006). "Behavioral sensitization to amphetamine results from an uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(19): 7476-7481.
- Schlussman, S. D., Y. Zhou, et al. (2005). "Steady-dose and escalating-dose "binge" administration of cocaine alter expression of behavioral stereotypy and striatal preprodynorphin mRNA levels in rats." Brain Res Bull **67**(3): 169-175.
- Schultz, W. (2004). "Neural coding of basic reward terms of animal learning theory, game theory, microeconomics and behavioural ecology." Curr Opin Neurobiol **14**(2): 139-147.
- Schultz, W. (2006). "Behavioral theories and the neurophysiology of reward." Annu Rev Psychol **57**: 87-115.
- Schultz, W. and A. Dickinson (2000). "Neuronal coding of prediction errors." Annu Rev Neurosci **23**: 473-500.
- Schultz, W., K. Preuschoff, et al. (2008). "Explicit neural signals reflecting reward uncertainty." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **363**(1511): 3801-3811.
- Segal, D. S. and R. Kuczenski (1992). "Repeated cocaine administration induces behavioral sensitization and corresponding decreased extracellular dopamine responses in caudate and accumbens." Brain Res **577**(2): 351-355.
- Self, D. W., W. J. Barnhart, et al. (1996). "Opposite modulation of cocaine-seeking behavior by D1- and D2-like dopamine receptor agonists." Science **271**(5255): 1586-1589.
- Seroogy, K. B. and C. M. Gall (1993). "Expression of neurotrophins by midbrain dopaminergic neurons." Exp Neurol **124**(1): 119-128.
- Sesack, S. R. and A. A. Grace (2010). "Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry." Neuropsychopharmacology **35**(1): 27-47.
- Seymour, C. M. and J. J. Wagner (2008). "Simultaneous expression of cocaine-induced behavioral sensitization and conditioned place preference in individual rats." Brain Res **1213**: 57-68.
- Sharp, T., T. Zetterstrom, et al. (1987). "A direct comparison of amphetamine-induced behaviours and regional brain dopamine release in the rat using intracerebral dialysis." Brain Res **401**(2): 322-330.
- Shirayama, Y. and S. Chaki (2006). "Neurochemistry of the nucleus accumbens and its relevance to depression and antidepressant action in rodents." Curr Neuropharmacol **4**(4): 277-291.
- Shurman, J., G. F. Koob, et al. (2010). "Opioids, pain, the brain, and hyperkatifeia: a framework for the rational use of opioids for pain." Pain Med **11**(7): 1092-1098.
- Sibley, D. R., F. J. Monsma, Jr., et al. (1993). "Molecular neurobiology of dopaminergic receptors." Int Rev Neurobiol **35**: 391-415.

- Sleipness, E. P., B. A. Sorg, et al. (2007). "Diurnal differences in dopamine transporter and tyrosine hydroxylase levels in rat brain: dependence on the suprachiasmatic nucleus." Brain Res **1129**(1): 34-42.
- Smith, J. A., Q. Mo, et al. (1995). "Cocaine increases extraneuronal levels of aspartate and glutamate in the nucleus accumbens." Brain Res **683**(2): 264-269.
- Sokoloff, P., O. Guillin, et al. (2002). "Brain-derived neurotrophic factor controls dopamine D3 receptor expression: implications for neurodevelopmental psychiatric disorders." Neurotox Res **4**(7-8): 671-678.
- Sousa, F. C., P. B. Gomes, et al. (1999). "Early withdrawal from repeated cocaine administration upregulates muscarinic and dopaminergic D2-like receptors in rat neostriatum." Pharmacol Biochem Behav **62**(1): 15-20.
- Spealman, R. D., R. L. Barrett-Larimore, et al. (1999). "Pharmacological and environmental determinants of relapse to cocaine-seeking behavior." Pharmacol Biochem Behav **64**(2): 327-336.
- Stanwood, G. D., I. Lucki, et al. (2000). "Differential regulation of dopamine D2 and D3 receptors by chronic drug treatments." J Pharmacol Exp Ther **295**(3): 1232-1240.
- Stephan, F. K. (2002). "The "other" circadian system: food as a Zeitgeber." J Biol Rhythms **17**(4): 284-292.
- Stephan, F. K., J. M. Swann, et al. (1979a). "Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions." Behav Neural Biol **25**(4): 545-554.
- Stephan, F. K., J. M. Swann, et al. (1979b). "Anticipation of 24-hr feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus." Behav Neural Biol **25**(3): 346-363.
- Striplin, C. D. and P. W. Kalivas (1992). "Correlation between behavioral sensitization to cocaine and G protein ADP-ribosylation in the ventral tegmental area." Brain Res **579**(2): 181-186.
- Stuber, G. D., F. W. Hopf, et al. (2010). "Neuroplastic alterations in the limbic system following cocaine or alcohol exposure." Curr Top Behav Neurosci **3**: 3-27.

T

- Tassin, J. P., C. Lanteri, et al. (2006). "[Uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons: As a mechanism for drug addiction]." Med Sci (Paris) **22**(10): 798-800.
- Tataroglu, O., A. J. Davidson, et al. (2006). "The methamphetamine-sensitive circadian oscillator (MASCO) in mice." J Biol Rhythms **21**(3): 185-194.
- Tepper, J. M., B. C. Sun, et al. (1997). "Functional roles of dopamine D2 and D3 autoreceptors on nigrostriatal neurons analyzed by antisense knockdown in vivo." J Neurosci **17**(7): 2519-2530.
- Terwilliger, R. Z., D. Beitner-Johnson, et al. (1991). "A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function." Brain Res **548**(1-2): 100-110.
- Thoenen, H. (1995). "Neurotrophins and neuronal plasticity." Science **270**(5236): 593-598.
- Thomas, M. J., C. Beurrier, et al. (2001). "Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine." Nat Neurosci **4**(12): 1217-1223.
- Tobler, P. N., A. Dickinson, et al. (2003). "Coding of predicted reward omission by dopamine neurons in a conditioned inhibition paradigm." J Neurosci **23**(32): 10402-10410.
- Tsukada, H., J. Kreuter, et al. (1996). "Effects of binge pattern cocaine administration on dopamine D1 and D2 receptors in the rat brain: an in vivo study using positron emission tomography." J Neurosci **16**(23): 7670-7677.

U

- Uhl, G. R., F. S. Hall, et al. (2002). "Cocaine, reward, movement and monoamine transporters." Mol Psychiatry **7**(1): 21-26.

- Unterwald, E. M., J. Fillmore, et al. (1996). "Chronic repeated cocaine administration increases dopamine D1 receptor-mediated signal transduction." *Eur J Pharmacol* **318**(1): 31-35.
- Unterwald, E. M., A. Ho, et al. (1994). "Time course of the development of behavioral sensitization and dopamine receptor up-regulation during binge cocaine administration." *J Pharmacol Exp Ther* **270**(3): 1387-1396.
- Unterwald, E. M., M. J. Kreek, et al. (2001). "The frequency of cocaine administration impacts cocaine-induced receptor alterations." *Brain Res* **900**(1): 103-109.
- Usiello, A., J. H. Baik, et al. (2000). "Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors." *Nature* **408**(6809): 199-203.

V

- Vanderschuren, L. J. and P. W. Kalivas (2000). "Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies." *Psychopharmacology (Berl)* **151**(2-3): 99-120.
- Voorn, P., C. R. Gerfen, et al. (1989). "Compartmental organization of the ventral striatum of the rat: immunohistochemical distribution of enkephalin, substance P, dopamine, and calcium-binding protein." *J Comp Neurol* **289**(2): 189-201.
- Vorspan, F., G. Brousse, et al. (2012). "Cocaine-induced psychotic symptoms in French cocaine addicts." *Psychiatry Res.*

W

- Waelti, P., A. Dickinson, et al. (2001). "Dopamine responses comply with basic assumptions of formal learning theory." *Nature* **412**(6842): 43-48.
- Walters, J. R., D. A. Bergstrom, et al. (1987). "D1 dopamine receptor activation required for postsynaptic expression of D2 agonist effects." *Science* **236**(4802): 719-722.
- Wang, Y., R. Xu, et al. (2000). "Dopamine D2 long receptor-deficient mice display alterations in striatum-dependent functions." *J Neurosci* **20**(22): 8305-8314.
- Weiss, F., C. S. Maldonado-Vlaar, et al. (2000). "Control of cocaine-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats: effects on recovery of extinguished operant-responding and extracellular dopamine levels in amygdala and nucleus accumbens." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(8): 4321-4326.
- Weiss, F., M. P. Paulus, et al. (1992a). "Increases in extracellular dopamine in the nucleus accumbens by cocaine are inversely related to basal levels: effects of acute and repeated administration." *J Neurosci* **12**(11): 4372-4380.
- Weiss, S. R., R. M. Post, et al. (1989). "Context-dependent cocaine sensitization: differential effect of haloperidol on development versus expression." *Pharmacol Biochem Behav* **34**(3): 655-661.
- Wheeler, R. A., B. J. Aragona, et al. (2011). "Cocaine cues drive opposing context-dependent shifts in reward processing and emotional state." *Biol Psychiatry* **69**(11): 1067-1074.
- White, F. J., X. T. Hu, et al. (1995). "Repeated administration of cocaine or amphetamine alters neuronal responses to glutamate in the mesoaccumbens dopamine system." *J Pharmacol Exp Ther* **273**(1): 445-454.
- Wise, R. A. (2004). "Rewards wanted: Molecular mechanisms of motivation." *Discov Med* **4**(22): 180-186.
- Wolf, M. E. (1998). "The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants." *Prog Neurobiol* **54**(6): 679-720.
- Woolverton, W. L. and K. M. Johnson (1992). "Neurobiology of cocaine abuse." *Trends Pharmacol Sci* **13**(5): 193-200.

X

Xie, X. and J. D. Steketee (2008). "Repeated exposure to cocaine alters the modulation of mesocorticolimbic glutamate transmission by medial prefrontal cortex Group II metabotropic glutamate receptors." J Neurochem **107**(1): 186-196.

Y

Ying, S. W., M. Futter, et al. (2002). "Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis." J Neurosci **22**(5): 1532-1540.

Z

Zeigler, S., J. Lipton, et al. (1991). "Continuous cocaine administration produces persisting changes in brain neurochemistry and behavior." Brain Res **552**(1): 27-35.

ANNEXE

Puig S., Noble F. Benturquia N. Short- and long-lasting behavioral and neurochemical adaptations: relationship with patterns of cocaine administration and expectation of drug effects in rats. (2012) Translational Psychiatry.

Short- and long-lasting behavioral and neurochemical adaptations: relationship with patterns of cocaine administration and expectation of drug effects in rats.

Stephanie PUIG^{1,2,3}, Florence NOBLE^{1,2,3}, Nadia BENTURQUIA^{1,2,3}

¹ Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8206

² Institut national de la santé et de la recherche médicale, U 705

³ Université Paris Descartes, Laboratoire de Neuropsychopharmacologie des Addictions, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris

Corresponding Author :

Florence NOBLE

Laboratoire de neuropsychopharmacologie des addictions

CNRS UMR 8206 - INSERM U 705

Faculté de Pharmacie

4, avenue de l'Observatoire

75006 Paris

Tel : +33 (0)1 53 73 95 61

E-mail : florence.noble@parisdescartes.fr

Running Title:

Pattern of cocaine treatment and neuroadaptations.

Abstract:

Cocaine dependence is a significant public health problem, characterized by periods of abstinence. Chronic exposure to drugs of abuse induces important modifications on neuronal systems, including the dopaminergic system. The pattern of administration is an important factor that should be taken into consideration to study the neuroadaptations. We compared the effects of intermittent (once daily) and binge (three times a day) cocaine treatments for 14 days 1 (WD1) and 14 (WD14) days after the last cocaine injection on spontaneous locomotor activity and dopamine levels in the nucleus accumbens (Nac). The intermittent treatment led to a spontaneous increase in dopamine (WD1/WD14), and in locomotor activity (WD1) at the exact hour which rats were habituated to receive a cocaine injection. These results underline that taking into consideration the hours of the day at which the experiments are performed is crucial. We also investigated these behavioral and neurochemical adaptations in response to an acute cocaine challenge on WD1 and WD14. We observed that only the binge treatment led to sensitization of locomotor effects of cocaine, associated to a dopamine release sensitization in the Nac, whereas the intermittent treatment did not. We demonstrate that two different patterns of administration induced distinct behavioral and neurochemical consequences. We unambiguously demonstrated that the intermittent treatment induced drug expectation associated with higher basal dopamine level in the nucleus accumbens when measured at the time of chronic cocaine injection and that the binge treatment led to behavioral and sensitization effects of cocaine.

Keywords:

Cocaine, dopamine, expectation, locomotor sensitization, pattern of administration.

Introduction:

Cocaine is a widely abused drug that possesses a significant health concern with major social and economic ramifications. Cocaine addiction is a process which generally starts with recreational use and deteriorates over time into a compulsive and chronic-relapsing drug taking disorder.¹ Despite longstanding efforts to identify compounds capable of selectively inhibiting the addictive effects of cocaine, there are currently no approved medications for the treatment of cocaine abuse or toxicity. Nevertheless, addiction is a complex pathology, multifactorial, which may explain why the clinical trials performed to evaluate the therapeutic potential of pharmacotherapies are unsatisfactory. Several parameters can and should be taken into considerations, including the pattern of administration, and the transient or long-lasting neurochemical and behavioral abnormalities following drug administration.

To achieve a good understanding of the neuroadaptations induced by cocaine, the use of animal models provides enormous potential, through a coordinated analysis of brain function and behavior. As previously mentioned, the pattern of administration and the kinetics of the neuroadaptations are important factors that should be taken into consideration. Several studies reinforce this hypothesis.²⁻⁵ In addition, our laboratory has already studied the effects of manipulating the frequency of available injections by using a discrete trials procedure, showing that two different patterns of morphine treatment induced distinct behavioral and neurochemical consequences with different time courses.⁶ Cocaine exerts its pharmacological action through the monoamine systems. In particular, dopamine projections to the striatum have been implicated greatly in reinforcement and motor behaviours produced by cocaine.⁷ Thus the first aim of our study was to investigate and compare the spontaneous behavioral and neurochemical consequences of two 14-days chronic cocaine pretreatment regimens (intermittent versus binge), both of which are used extensively in laboratories to mimic patterns of cocaine abuse in humans. Extracellular dopamine levels were evaluated 1 (WD1)

and 14 (WD14) days after the last cocaine injection. In parallel to this, the locomotor activity of the animals was measured during 24 hours on WD1 and WD14. These experiments were performed either exactly at the hours at which rats were habituated to receive a cocaine injection, or at another hour of the day. We showed that intermittent and binge cocaine treatments induced distinct behavioral and neurochemical consequences with different time courses. The second aim of this study was to investigate the behavioral and neurochemical responses to an acute cocaine challenge following chronic cocaine pretreatment. Here again, we showed that the patterns of chronic cocaine administration induced distinct consequences, with behavioral and neurochemical sensitization only observed following the binge treatment.

Materials & Methods:

Animals:

Male Sprague-Dawley rats (Janvier, France) weighing 275-300 g at the beginning of the treatments were housed on a 12 hours light/dark cycle in a temperature- (22 ± 1 °C) and humidity-controlled ($50\pm 5\%$) environment and had access to food and water *ad libitum*. Animals were treated in accordance with the *NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals* (1995) and in agreement with the local ethical committee. The number of animals used and their suffering was minimized in all experiments designed.

Cocaine treatments:

Animals were treated by an Intermittent Cocaine (IC) or a Binge Cocaine (BC) administration profile, consisting in intraperitoneal (i.p.) injections of 20 mg/kg cocaine hydrochloride (Francopia, France), dissolved in saline (0.9% (w/v) NaCl) during 14 days, once daily at 10 a.m. for the Intermittent profile and three times a day at 10 a.m., 1 p.m. and 4 p.m. for the Binge profile. All animals received 1ml/kg of their bodyweight. Control groups were treated with saline in the same conditions (IS or BS). Immediately after injection, rats were returned to their home cages.

Behavioral study:

Locomotor activity was evaluated on WD1 and WD14 after the end of the treatments (see supplementary Figure 1), in an actimeter (Immetronic, France) composed of eight cages (34x21x19cm) under low illumination (<5 lux). One rat was placed in each box to record its movements. Displacements were measured by photocell beams located across the long axis and above the floor. Vertical and horizontal activity was recorded and expressed in scores (mean \pm SEM) as the total number of interruption of the photocell beams. The 12/12 hours light/dark cycle was respected.

For the spontaneous locomotor activity on WD1 : animals were placed during 24h in the actimeter 2h after the last injection of the chronic treatment; and on WD14 : the same protocol was used, animals were placed during 24h in the actimeter in day 27 plus 2h.

In other groups of animals, we have evaluated the locomotor activity response to cocaine (20 mg/kg, i.p.) or saline challenge; animals were challenged out of the usual hours of the injection treatment (on WD1 and WD14) and immediately placed in the actimeter during 1 hour.

Neurochemical study:

Surgery: rats were anesthetized by an i.p. injection of a mixture of ketamine/xylazine (80/10 mg/kg) and placed in a stereotaxic apparatus (Unimécanique). A guide cannula (CMA 12, Phymep, France) was stereotaxically implanted in the nucleus accumbens core (Nacc). The coordinates, taken from the atlas of Paxinos and Watson (1998) were + 1.6 mm anterior to the interaural, +1.4 mm lateral to the midline, and - 6.0 mm under the skull surface. Animals were used for experiments after a recovery period of one week.

Judgments about cannula placements in the Nacc were made by an observer who was blind to the results obtained with individual rats. Only the rats implanted into the Nacc were analyzed in the study (the fail rate for the implantation was 5/100, supplementary Figure 2).

Microdialysis procedures were done on WD1 and WD14 after the end of the treatments (supplementary Figure 1b.). Rats were gently restrained, the stylus was removed from the guide cannula and the probe (CMA 12 Ellit, 2mm, Phymep, France) was implanted and perfused at 2 µl/min. The perfusate consisted in artificial cerebrospinal fluid containing (in mM) NaCl 140, KCl 4, MgCl₂ 1, NaH₂ PO₄ 0.1, Na₂HPO₄ 1.9 and CaCl₂ 1.2 (pH = 7.4). After two hours equilibration of the microdialysis membrane, samples were collected every 30 min in tubes containing 5 µl HClO₄ 0.4 M in order to prevent DA oxidation and conserved at -80°C until the quantification.

For the measure of the DA level at injection hours and evaluation of the neurochemical response to a cocaine challenge, the samples collection occurred on WD1 and WD14.

For the DA basal level, two samples was collected out of the usual hours of chronic injection treatment, then two other samples was collected at the exact hour when rats were habituated to receive cocaine without any injection. We have evaluated DA release to a cocaine challenge, few hours later, out of the usual hours of injection chronic treatment, two samples were collected following intraperitoneal (challenge injection (cocaine or saline)).

In order to exclude effect of association drug-spatial cues, drug treatment was performed in a different room of the microdialysis room.

DA analysis: DA content was determined as previously described⁸ using HPLC apparatus coupled to electrochemical detector (Coulchem III, ESA Inc., USA).

Statistical analysis.

The neurochemical studies in drug free conditions were analyzed by a two-tailed t-test. A one-way analysis of variance (one-way ANOVA) was used to analyze locomotor activity in response to a cocaine challenge. A two-way ANOVA was used for the analysis of the locomotor activity measured during 24 hours in drug free conditions (treatment x time), and for the analysis of DA levels in the Nacc following a cocaine challenge injection (treatment x microdialysate). The Bonferroni test was used for post-hoc comparisons.

Results

Spontaneous neurochemical and behavioral consequences of chronic cocaine treatment.

Spontaneous locomotor activity.

The measure during 24 hours of locomotor activity 2h after the last injection of treatment showed differences in behavioral regulation (Figure 1). A two-way ANOVA showed a significant treatment x time interaction for the intermittent profile on WD1 ($F_{(1,20)}=2.36$, $p<0.001$) (Figure 1a), with a significant time effect ($F_{(1,20)}=5.39$, $p<0.0001$), but no treatment effect ($F_{(1,20)}=1.39$, N.S.). Post-hoc analysis showed an increase of locomotion for the IC group as compared to IS group during the 24th and 25th hour after the last injection, corresponding exactly to the hour when rats were habituated to be injected. This effect did not persist after 14 days of withdrawal (Figure 1b) as no significant treatment x time interaction ($F_{(1,19)}=1.05$, N.S.) was observed, with no treatment effect ($F_{(1,19)}=1.75$, N.S.), but a significant time effect ($F_{(1,19)} = 12.05$, $p<0.0001$).

Unlike intermittent treated animals, the locomotion of binge animals on WD1 or on WD14 was not changed during the 24 hours of measurement in comparison with the saline (Figure 1c and 1d). However, significant treatment x time interactions were observed, which were mainly due to a higher locomotor activity measured during the first hour, in the cocaine treated animals in comparison with saline group (WD1 Figure 1c: treatment x time interaction: $F_{(1,25)}=2.15$, $p<0.01$, treatment effect: $F_{(1, 25)}=0.14$, N.S. and time effect: $F_{(1, 25)}=4.31$, $p<0.0001$; WD14 Figure 1d: treatment x time interaction: $F_{(1,21)}=2.26$, $p<0.001$, treatment effect: $F_{(1, 21)}=0.36$, N.S., and time effect: $F_{(1,21)}=4.21$, $p<0.0001$).

As shown in Figure 1d we observed an increase in locomotor activity at day 27 after the beginning of the treatment in the binge cocaine group as compared to saline group between time point +4 and +10 hours. However, this increase was not statistically significant.

Basal extracellular level of DA.

At a time that did not match the hours of injection, the levels of extracellular DA was evaluated in the Nacc using microdialysis in awake and freely moving rats.

As shown on Figure 2a, two tailed t-test revealed a decrease of basal dopamine levels, 1 day after the end of the treatment, for the IC and BC groups in comparison with their respective saline control group (Figure 2a, IC: $n=15$, $t_{(13)}=2.49$, $p<0.05$; BC $n=13$, $t_{(11)}=2.50$, $p<0.05$). This effect persisted after 14 days of withdrawal for the IC group (WD14, Figure 2b, $n=15$, $t_{(13)}=2.57$, $p<0.05$). No significant difference in basal levels of dopamine for the BC group in comparison with the BS group was observed.

Injection hour extracellular level of DA.

As shown in Figure 3, two tailed t-test revealed a significant increase of extracellular DA levels in the Nacc core, 1 day after the end of treatments as compared to the basal levels, at the time corresponding to the injection hours for both treatment profiles, IC ($n=20$, $t_{(18)}=3.81$, $p<0.01$) and BC ($n=12$, $t_{(10)}=2.36$, $p<0.01$). Interestingly, this effect was still observed on WD14 only in the IC group ($n=15$, $t_{(13)}=2.86$, $p<0.05$) (Figure 3b).

Behavioral and neurochemical responses to a cocaine challenge (out of the usual hours of injection treatment):

Locomotor activity

As shown in Figure 4, the locomotor activity responses observed for 1 hour immediately following saline or cocaine administration on WD1 or WD14 days were not modified in IC group in comparison with the control group. One-way ANOVA showed a significant effect of cocaine challenge, with an increase in the locomotor activity in both cocaine- and saline-treated animals (WD1, Figure 4a: intermittent: $F_{(3, 43)}=20.67$, $p<0.0001$; WD14, Figure 4b, $F_{(3, 44)}=23.50$, $p<0.0001$).

For the binge treatment, Figure 4c clearly showed a significant sensitization to the hyperlocomotor effect induced by cocaine on WD1 ($F_{(3, 41)}=40.89$, $p<0.0001$; Bonferroni BS challenge cocaine vs. BC challenge cocaine $p<0.01$). On WD14 the locomotor activity was not modified in comparison with the control group. One-way ANOVA showed a significant effect of cocaine challenge, with an increase in the locomotor activity in both cocaine- and saline- treated animals ($F_{(3, 40)}=20.21$, $p<0.0001$). No differences in the locomotor activity responses were observed after a cocaine challenge, between the cocaine- and saline-treated animals.

Extracellular dopamine level.

As shown in Figure 5a, cocaine challenge on WD1 induced an increase in the extracellular DA levels in IC and IS treated rats as compared to animals which received a saline challenge treatment (interaction: $F_{(3, 21)}=3.03$, $p<0.01$, treatment effect: $F_{(3, 21)}=4.72$, $p<0.05$, time effect: $F_{(3, 21)}=11.76$, $p<0.0001$). Similar results were observed on WD14 (two-way ANOVA: interaction: $F_{(3, 20)} = 2.84$, $p<0.01$, treatment effect: $F_{(3, 20)}= 3.39$, $p<0.05$, time effect: $F_{(3,20)}=8.76$, $p<0.0001$) (Figure 5b).

In the BC profile on WD1, the two-way ANOVA showed a significant interaction ($F_{(3, 24)}=2.37$, $p<0.05$), treatment effect ($F_{(3, 24)}=3.66$, $p<0.05$) and time effect ($F_{(3, 24)}=8.76$, $p<0.0001$). Post-hoc analysis revealed (Figure 5c) a greater increase of extracellular dopamine level following cocaine challenge in BC group ($+164\% \pm 53.83$ of basal levels), in comparison with the control group that received cocaine for the first time ($+72\% \pm 46.87$ of basal levels). As shown in Figure 5d this neurochemical sensitization was not observed on WD14. (Two-way ANOVA: interaction: $F_{(3, 24)}=2.29$, $p<0.05$, treatment effect: $F_{(3, 24)}=5.39$, $p<0.01$, time effect: $F_{(3, 24)}=8.28$, $p<0.001$).

Discussion

In the present study, the short- and long-term behavioral and neurochemical consequences of two distinct cocaine pretreatment regimens (“Intermittent” versus “Binge”) were compared. The main finding of this study is that intermittent and binge cocaine treatments induce different behavioral and neurochemical adaptations, which may be long-lasting.

The results indicated that chronic cocaine administration led to a significant lowering of the basal dopamine levels in the Nacc for both intermittent and binge treatments. Interestingly this effect was long-lasting, as 14 days after the last injection a lower DA level was observed in IC group as compared to IS group. However, it is interesting to note that the basal level for the binge cocaine treatment on WD14 seems be the same with the other cocaine groups. The decrease in dopamine level in the binge saline group observed on WD14 is complex to explain although it is highly reproducible. Binge saline rats received saline injection three times daily for 14 days which may induce stress, well known to induce an inhibition of DA release in the NAcc.^{9,10}

These decrease of DA levels observed in cocaine treated groups as compared to saline groups are consistent with other studies showing a decrease in basal dopamine levels in Nacc following a chronic “binge” cocaine injection paradigm,¹¹ in rats injected with cocaine twice daily for 9 or 14 days,^{12,13} in rats which received a single daily injection of cocaine 10 days¹⁴ or 18 days¹⁵ and also in two mouse strains which received cocaine injection three times a day for 14 days¹⁶. However, it is also important to note that some studies have shown no change,¹⁷⁻¹⁸ while others have shown an increase in the Nacc DA levels in rats which received a single daily injection of cocaine 10 days on WD1, WD3 and WD7² or on WD2 but not on WD12 and WD22¹⁹. In the majority of these studies, cocaine was administered at doses ranging from 10-30 mg/kg, and in most of the cases extracellular dopamine level was

measured 24h after the last injection of cocaine, but with few indications regarding the specific hour of the day at which the microdialysis experiments were performed. However, our results demonstrate for the first time that this parameter is crucial and may explain the differences of results of the previous studies. Thus, when microdialysis experiments were performed at the exact hours which rats were habituated to receive a cocaine injection, an increase in DA levels was observed. This effect was long-lasting in the intermittent group, as this regulation was still observed 14 days after the last injection of cocaine. Therefore, while a low extracellular dopamine level was observed in the Nacc following binge and intermittent cocaine treatments, an increase in the phasic release was observed at the usual hours of cocaine injection. Several hypotheses may be found in the literature regarding these regulations. For instance the lower DA levels are correlated to an increase in the density of the DAT binding sites and to a supersensitivity of D2 autoreceptors in the dopamine terminals.²⁰ On the other hand, several lines of evidence suggest that phasic release of dopamine from the ventral tegmental area to the nucleus accumbens occurs at the time of anticipation of reward.^{8,21-24}

Strikingly, behavioral analysis indicated an increase in locomotor activity at the hours of cocaine injection in the IC group. This behavioral response may be in good agreement with the increase on DA release observed at the same hours, as it is well established that dopamine play a key role in motor function. Cocaine may induce a memory trace which can be evaluated at behavioral and neurochemical levels during the anticipation phase of the drug administration. Interestingly, the “neurochemical memory” was longer-lasting (WD1 and WD14) than the “behavioral memory” (only WD1). This is the first demonstration of a neurochemical memory without cues associated to cocaine administration. This memory observed, by choosing the right time point for behavioral and neurochemical testing, can be due to a disturbance of the circadian rhythm. Indeed, it has been demonstrated that chronic

exposure to drugs of abuse affects the circadian rhythm of physiological functions and behaviours.²⁵⁻²⁷ Moreover, psychostimulant-induced effects, such as behavioural sensitization and conditioned place preference, have been shown to follow circadian variations in their intensities²⁸⁻³⁰.

The second aim of our study was to examine the effects of acute cocaine challenge on locomotor activity and DA release. In animal models, a hallmark feature associated with chronic exposure to drugs of abuse, including cocaine, is locomotor sensitization.^{31,32,20} In some cases, this sensitized behavioral response is correlated with enhanced drug-induced dopamine responses in the nucleus accumbens.^{31-33,20} In this study we demonstrated that the expression of a specific cocaine-induced behavior sensitization was related to the profile of administration. The binge treatment led to sensitization of locomotor effects of cocaine whereas the intermittent treatment did not. These results are in good agreement with the literature, showing that patterns of administration are of particular importance, as they could determine duration and intensity of sensitization.^{34,20,6} Interestingly, the locomotor sensitization observed in the binge group was associated to a dopamine release sensitization in the NAcc after a cocaine challenge on WD1. These results are supported by the reported increase in dopamine release in the Nacc in response to a subsequent challenge drug injection in animals previously exposed to cocaine.^{31-33,20}

Regarding the neurochemical and behavioral consequences of the two patterns of cocaine administration important differences were observed. Interestingly, it clearly appeared from the experiments performed to evaluate the spontaneous behavior and basal extracellular levels of DA in the Nacc, that the ability of the dopamine system to adapt to an event was maintained in the intermittent group, whereas it was impaired in the binge group. Indeed, exactly at the hours at which rats were habituated to receive a cocaine injection, a spontaneous increase in DA on WD1 until WD14, with an increase in locomotor activity on WD1 were observed in

the former group, while only a spontaneous DA release on WD1 was measured in the latter group. Moreover, following acute cocaine challenge behavioral and neurochemical sensitizations were only observed in rats previously exposed to binge treatment. It is well known that chronic cocaine exposure induces enduring neuroadaptations that collectively result in the loss of control over drug-seeking behavior. In particular, locomotor sensitization, the augmented response to cocaine following repeated exposure, has been shown to have predictive validity for other indicators of addiction. Thus, in our experimental conditions, the binge pattern may be associated with the development of important behavioral and neurochemical modifications. In contrast, the intermittent pattern allowed rapid locomotor and DA increase when animals anticipated the drug administration, and did not lead to locomotor sensitization, suggesting that the addicted state was not completely installed and the system is still able to adapt to a specific event.

In conclusion, the results obtained clearly illustrate that the pattern of administration is a crucial parameter that should be taken into consideration while exploring the behavioral and neurochemical alterations in animals. Another very interesting result was that scheduling a cocaine injection on a daily basis led to expectation and anticipation in our experimental model. This circadian process could explain learned drug-taking patterns in which individuals search for drugs of abuse at specific hours of the day generally in a specific environment.

1. Mendelson JH, Mello NK. Management of cocaine abuse and dependence. *N Engl J Med* 1996; **334**(15): 965-972.
2. Weiss F, Paulus MP, Lorang MT, Koob GF. Increases in extracellular dopamine in the nucleus accumbens by cocaine are inversely related to basal levels: effects of acute and repeated administration. *J Neurosci* 1992; **12**(11): 4372-4380.
3. Unterwald EM, Kreek MJ, Cuntapay M. The frequency of cocaine administration impacts cocaine-induced receptor alterations. *Brain Res* 2001; **900**(1): 103-109.
4. Schlussman SD, Zhou Y, Bailey A, Ho A, Kreek MJ. Steady-dose and escalating-dose "binge" administration of cocaine alter expression of behavioral stereotypy and striatal preprodynorphin mRNA levels in rats. *Brain Res Bull* 2005; **67**(3): 169-175.
5. Bailey A, Gianotti R, Ho A, Kreek MJ. Downregulation of kappa-opioid receptors in basolateral amygdala and septum of rats withdrawn for 14 days from an escalating dose "binge" cocaine administration paradigm. *Synapse* 2007; **61**(10): 820-826.
6. Le Marec T, Marie-Claire C, Noble F, Marie N. Chronic and intermittent morphine treatment differently regulates opioid and dopamine systems: a role in locomotor sensitization. *Psychopharmacology (Berl)* 2011; **216**(2): 297-303.
7. Kalivas PW, Sorg BA, Hooks MS. The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behav Pharmacol* 1993; **4**(4): 315-334.
8. Benturquia N, Le Marec T, Scherrmann JM, Noble F. Effects of nitrous oxide on dopamine release in the rat nucleus accumbens and expectation of reward. *Neuroscience* 2008; **155**(2): 341-344.
9. Rossetti ZL, Lai M, Hmaidan Y, Gessa GL. Depletion of mesolimbic dopamine during behavioral despair: partial reversal by chronic imipramine. *Eur J Pharmacol* 1993; **242**(3): 313-315.
10. Ventura R, Cabib S, Puglisi-Allegra S. Genetic susceptibility of mesocortical dopamine to stress determines liability to inhibition of mesoaccumbens dopamine and

- to behavioral 'despair' in a mouse model of depression. *Neuroscience* 2002; **115**(4): 999-1007.
11. Maisonneuve IM, Ho A, Kreek MJ. Chronic administration of a cocaine "binge" alters basal extracellular levels in male rats: an in vivo microdialysis study. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; **272**(2): 652-657.
 12. Imperato A, Mele A, Scrocco MG, Puglisi-Allegra S. Chronic cocaine alters limbic extracellular dopamine. Neurochemical basis for addiction. *Eur J Pharmacol* 1992; **212**(2-3): 299-300.
 13. Rossetti ZL, Melis F, Carboni S, Gessa GL. Dramatic depletion of mesolimbic extracellular dopamine after withdrawal from morphine, alcohol or cocaine: a common neurochemical substrate for drug dependence. *Ann N Y Acad Sci* 1992; **654**: 513-516.
 14. Parsons LH, Smith AD, Justice JB, Jr. Basal extracellular dopamine is decreased in the rat nucleus accumbens during abstinence from chronic cocaine. *Synapse* 1991; **9**(1): 60-65.
 15. Robertson MW, Leslie CA, Bennett JP, Jr. Apparent synaptic dopamine deficiency induced by withdrawal from chronic cocaine treatment. *Brain Res* 1991; **538**(2): 337-339.
 16. Zhang Y, Schlussman SD, Ho A, Kreek MJ. Effect of chronic "binge cocaine" on basal levels and cocaine-induced increases of dopamine in the caudate putamen and nucleus accumbens of C57BL/6J and 129/J mice. *Synapse* 2003; **50**(3): 191-199.
 17. Segal DS, Kuczenski R. Repeated cocaine administration induces behavioral sensitization and corresponding decreased extracellular dopamine responses in caudate and accumbens. *Brain Res* 1992; **577**(2): 351-355.

18. Kalivas PW, Duffy P. Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. I. Dopamine axon terminals. *J Neurosci* 1993; **13**(1): 266-275.
19. Heidbreder CA, Thompson AC, Shippenberg TS. Role of extracellular dopamine in the initiation and long-term expression of behavioral sensitization to cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; **278**(2): 490-502.
20. Kalivas PW, Duffy P. Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. II. Dopamine perikarya. *J Neurosci* 1993; **13**(1): 276-284.
21. Schultz W. Responses of midbrain dopamine neurons to behavioral trigger stimuli in the monkey. *J Neurophysiol* 1986; **56**(5): 1439-1461.
22. Phillips PE, Stuber GD, Heien ML, Wightman RM, Carelli RM. Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature* 2003; 422(6932): 614-618.
23. Wong DF, Kuwabara H, Schretlen DJ, Bonson KR, Zhou Y, Nandi A *et al*. Increased occupancy of dopamine receptors in human striatum during cue-elicited cocaine craving. *Neuropsychopharmacology* 2006; **31**(12): 2716-2727.
24. Volkow ND. Addiction Reviews. Introduction. *Ann N Y Acad Sci* 2008; **1141**: xi-xii.
25. Gawin FH. Cocaine addiction: psychology and neurophysiology. *Science* 1991; **251**(5001): 1580-1586.
26. Vescovi PP, Coiro V, Volpi R, Passeri M. Diurnal variations in plasma ACTH, cortisol and beta-endorphin levels in cocaine addicts. *Horm Res* 1992; **37**(6): 221-224.
27. Schierenbeck T, Riemann D, Berger M, Hornyak M. Effect of illicit recreational drugs upon sleep: cocaine, ecstasy and marijuana. *Sleep Med Rev* 2008; **12**(5): 381-389.

28. Abarca C, Albrecht U, Spanagel R. Cocaine sensitization and reward are under the influence of circadian genes and rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**(13): 9026-9030.
29. Akhisaroglu M, Ahmed R, Kurtuncu M, Manev H, Uz T. Diurnal rhythms in cocaine sensitization and in Period1 levels are common across rodent species. *Pharmacol Biochem Behav* 2004; **79**(1): 37-42.
30. Webb IC, Baltazar RM, Wang X, Pitchers KK, Coolen LM, Lehman MN. Diurnal variations in natural and drug reward, mesolimbic tyrosine hydroxylase, and clock gene expression in the male rat. *J Biol Rhythms* 2009; **24**(6): 465-476.
31. Akimoto K, Hamamura T, Otsuki S. Subchronic cocaine treatment enhances cocaine-induced dopamine efflux, studied by in vivo intracerebral dialysis. *Brain Res* 1989; **490**(2): 339-344.
32. Kalivas PW, Duffy P. Effect of acute and daily cocaine treatment on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *Synapse* 1990; **5**(1): 48-58.
33. Pierce RC, Duffy P, Kalivas PW. Sensitization to cocaine and dopamine autoreceptor subsensitivity in the nucleus accumbens. *Synapse* 1995; **20**(1): 33-36.
34. Vanderschuren LJ, Tjon GH, Nestby P, Mulder AH, Schoffelmeer AN, De Vries TJ. Morphine-induced long-term sensitization to the locomotor effects of morphine and amphetamine depends on the temporal pattern of the pretreatment regimen. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; **131**(2): 115-122.

Figure 1. Spontaneous locomotor activity. On WD1 (a and c) and on WD14 (b and d), locomotor activity was measured during 24 hours according to the protocol paradigm. The arrows indicate the usual hours of injection during the intermittent or binge treatment. Results were expressed in counts per hour (mean \pm SEM). * $p < 0.05$, Bonferroni test, (n=9 to 14). I: intermittent; B: binge; IS: intermittent saline; IC: intermittent cocaine; BS: binge saline; BC: binge cocaine.

Figure 2. Basal extracellular level of DA in the Nacc. Two dialysis samples were collected every 30 min on WD1(a) and on WD14 (b) to determine basal level of DA in the Nacc out of the usual hours of injection treatment. Each column represents the extracellular dopaminergic levels in ng/ml (mean \pm SEM). * $p < 0.05$ two-tailed t-test, (n= 6-10).

Figure 3. Injection hour extracellular level of DA in the Nacc. Two dialysis samples were collected every 30 min on WD1(a) and on WD14 (b) to determine the basal level of DA in the Nacc, then two dialysis samples were collected exactly at the time of the usual hours of injection for each treatment without a new injection. Each column represents the extracellular dopaminergic levels in ng/ml (mean \pm SEM). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, two-tailed t-test, (n= 6-14).

Figure 4. Locomotor response to an acute cocaine challenge. On WD1 (a and c) and on WD14 (b and d) animals received a cocaine or a saline acute challenge injection out of the usual hours of injection treatment. Locomotor activity was recorded during one hour and expressed in counts per hour (mean \pm SEM). *** $p < 0.0001$, IS saline challenge vs. IS cocaine challenge. ^^^ $p < 0.001$ IC saline challenge vs. IC cocaine challenge. +++ $p < 0.0001$ BS saline challenge vs. BS cocaine challenge. \$\$\$ $p < 0.0001$ BC saline challenge vs. BC cocaine challenge. ## $p < 0.05$ BS cocaine challenge vs. BC cocaine challenge; one way ANOVA, (n= 9-

14). I: intermittent; B: binge; IS: intermittent saline; IC: intermittent cocaine; BS: binge saline; BC: binge cocaine.

Figure 5. Extracellular dopamine in the Nacc following an acute cocaine challenge. The dialysis samples were collected every 30 min out of the injection hour. The basal concentrations of DA in the Nac core, measured before the challenge injection, were (ng/ml) for WD1, IS: 1.135 ± 0.144 , $n=9$, IC: 0.979 ± 0.060 $n=14$, BS: 1.129 ± 0.138 $n=11$, BC: 0.987 ± 0.069 $n=11$ and for WD14, IS: 1.259 ± 0.217 , $n=10$, IC: 1.001 ± 0.041 $n=10$, BS: 1.032 ± 0.076 $n=12$, BC: 1.005 ± 0.098 $n=12$. Results were expressed as percent (mean \pm SEM) of baseline value obtained before a challenge administration of cocaine or saline (black arrow) out of the usual hours of injection treatment. ** $p < 0.01$ IS saline challenge vs. IS cocaine challenge. $^{\wedge}p < 0.01$, $^{\wedge\wedge}p < 0.001$ IC saline challenge vs. IC cocaine challenge. $^{+}p < 0.05$, $^{++}p < 0.01$ BS saline challenge vs. BS cocaine challenge. $^{ss}p < 0.01$, $^{sss}p < 0.001$ BC saline challenge vs. BC cocaine challenge. $^{#}p < 0.05$ BS cocaine challenge vs. BC cocaine challenge; two-way ANOVA ($n=4-7$). IS: intermittent saline; IC: intermittent cocaine; BS: binge saline; BC: binge cocaine; s: saline challenge; c: cocaine challenge.

Figure 1.

Protocol paradigm :

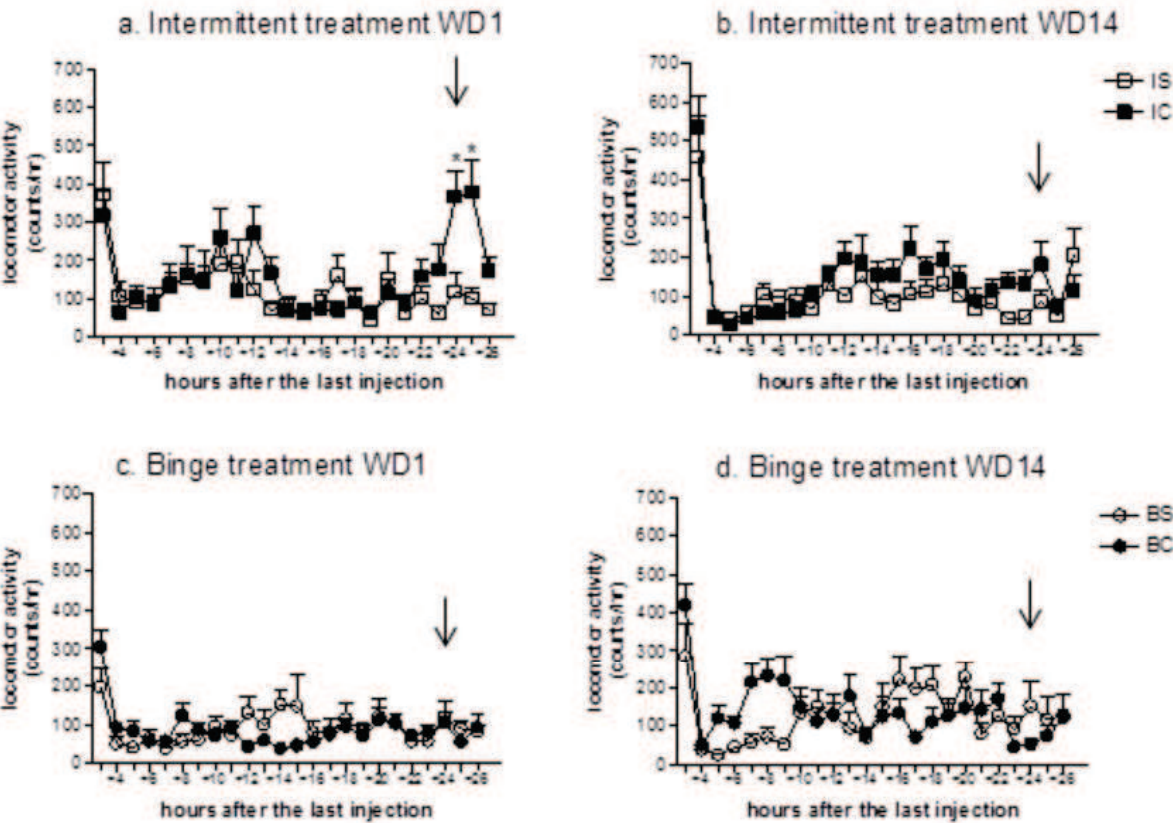
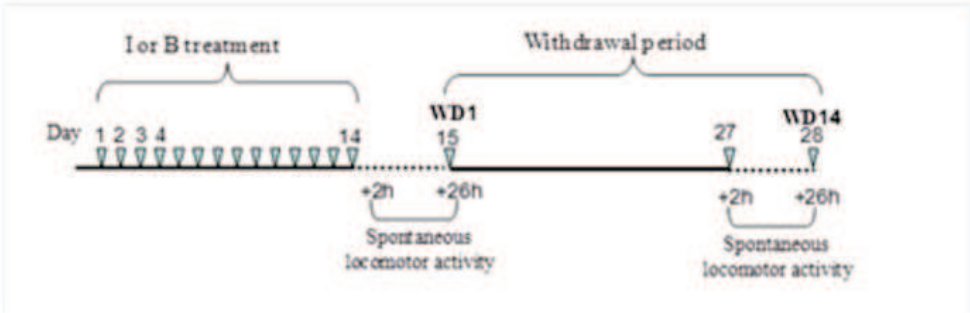


Figure 2.

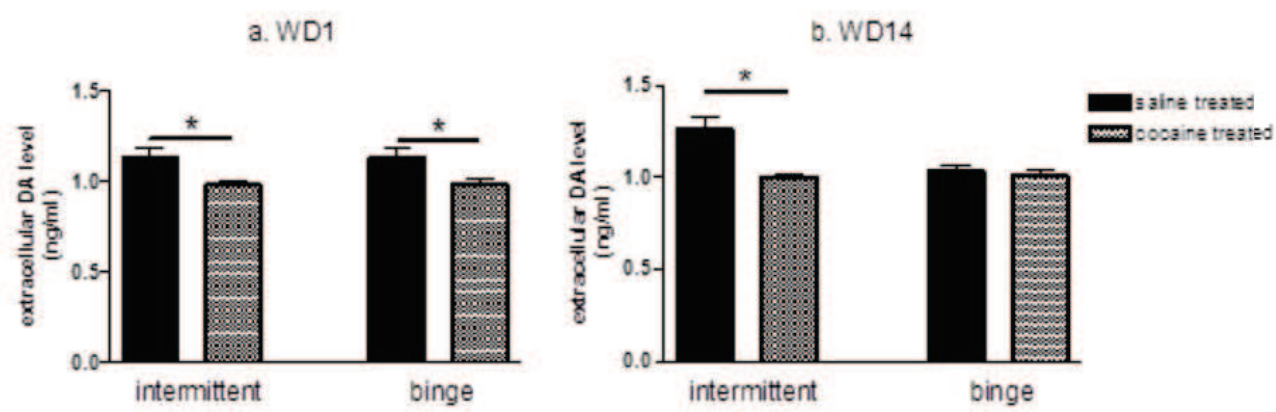


Figure 3.

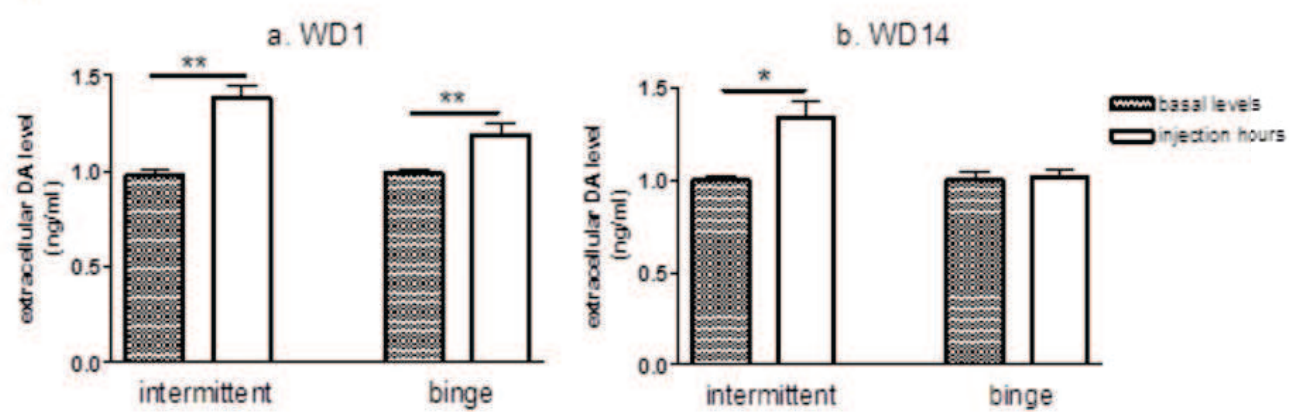


Figure 4.

Protocol paradigm :

